

Tesis de Posgrado

Prevención de la necrosis hepática producida por tetracloruro de carbono con tetraacetato de ditiotreitol

Montalto, María

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Montalto, María. (1996). Prevención de la necrosis hepática producida por tetracloruro de carbono con tetraacetato de ditiotreitol. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2820_Montalto.pdf

Cita tipo Chicago:

Montalto, María. "Prevención de la necrosis hepática producida por tetracloruro de carbono con tetraacetato de ditiotreitol". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2820_Montalto.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Prevención de la necrosis hepática producida por el
tetracloruro de carbono con tetraacetato de ditiotreitól***

María Montalto

Director: Dr. José Alberto Castro

Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones Toxicológicas
CEITOX - CITEFA / CONICET

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

- 1996 -

74
52

Prevención de la necrosis hepática producida por el tetracloruro de carbono con tetraacetato de ditioneitol

El tetraacetato de ditioneitol (DTTAc), compuesto estable y menos tóxico que el ditioneitol (DTT), se sintetizó y caracterizó por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

El DTTAc es hidrolizado, in vivo, a DTT. Se estableció la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa en sangre y en distintos órganos.

El DTT, generado in vivo a partir del DTTAc, ejerció un efecto protector sobre la necrosis hepática producida por el CCl₄. El tratamiento disminuyó significativamente la unión covalente (UC) de los metabolitos reactivos del CCl₄ a componentes celulares. Además, el DTT fue capaz de inhibir la peroxidación de lípidos (PL) in vitro y reaccionó significativamente con el peróxido de benzoílo en un sistema modelo.

En conclusión, el efecto protector del DTTAc podría deberse a la hidrólisis in vivo a DTT, el cual disminuirá la UC y la PL atrapando peróxidos, hidroperóxidos y radicales libres.

Palabras claves: tetracloruro de carbono, radicales libres, daño hepático, ditioneitol, tetraacetato de ditioneitol.

Protection against carbon tetrachloride induced liver necrosis by dithiothreitol tetraacetate

Dithiothreitol tetraacetate (DTTAc), which is chemically stable and less toxic than dithiothreitol (DTT), was synthesized and characterized by proton nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.

DTTAc is hydrolyzed in vivo to give DTT. DTTAc-thiolacetate esterase activity was determined in blood and in different organs.

DTT, generated in vivo from DTTAc, was able to significantly prevent the CCl₄-induced liver necrosis. The treatment decreased the intensity of covalent binding (CB) of the CCl₄ reactive metabolites to cellular components. Also, DTT was able to inhibit lipid peroxidation (LP) in vitro, and to react significantly with benzoyl peroxide in a model system.

In summary, DTTAc protective effects might be due to its in vivo hydrolysis to DTT, which would be able to decrease the intensity of CB and LP by trapping peroxides, hydroperoxides and free radical species.

Key words: carbon tetrachloride, free radicals, liver injury, dithiothreitol, dithiothreitol tetraacetate.

A mis hijas

Agradecimientos

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. José Alberto Castro, director y consejero de estudios de esta tesis, por su constante comprensión, apoyo y estímulo y por su valiosa colaboración académica.

Agradezco:

Al **Dr. Gerardo D. Castro** por acompañarme con su experiencia y cordialidad en todo momento. También por la realización de los espectros de masas y por colaborar en la realización de algunas experiencias y en la corrección del trabajo.

A la **Dra. Elida Cignoli de Ferreyra** por la realización de las fotos de los preparados histológicos y asesorarme en su interpretación.

A todos mis compañeros del **CEITOX**, los cuales mantuvieron un ambiente agradable de compañerismo y solidaridad.

A las **Srtas. Gabriela F. Numma y Analía C. Numma** por la transcripción de los manuscritos y su especial calidez y particular optimismo.

A mis compañeras de la **Cátedra de Toxicología y Química Legal de la FCE y N, UBA**, en especial a la **Dra. Eva M. Kesten** por alentarme en la realización de este trabajo.

Al **Lic. Darío Bongiovani** por la realización de los espectros de ^1H -RMN.

A la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA**, por mi formación de grado y de post-grado.

INDICE

I.	INTRODUCCION	
I.1	GENERALIDADES	1
I.2	DAÑO CELULAR POR TOXICOS	2
I.3	EFFECTOS TOXICOS DEL CCl₄ EN EL HOMBRE Y EN ANIMALES DE LABORATORIO	4
I.4	ABSORCION, DISTRIBUCION Y EXCRECION DEL CCl₄	5
I.5	CORRELACION ENTRE LOS EFECTOS TOXICOS DEL CCl₄ Y SU BIOTRANSFORMACION	6
I.5.1	Generalidades	6
I.5.2	Biotransformación de sustancias extrañas al organismo	7
I.5.3	Biotransformación y activación del CCl ₄	9
I.6	DAÑO CELULAR HEPATICO POR CCl₄	13
I.6.1	Generalidades	13
I.6.2	Interacciones de los radicales producidos por biotransformación del CCl ₄ con componentes celulares	18
I.6.3	Peroxidación de lípidos	21
I.6.4	Consecuencias de la peroxidación de lípidos	28
I.6.5	Estimulación del proceso de peroxidación de lípidos por CCl ₄	29
I.7	PREVENCION DEL DAÑO HEPATICO INDUCIDO QUIMICAMENTE	31
I.7.1	Generalidades	31
I.7.2	Inhibición de la activación metabólica	33
I.7.3	Agentes químicos atrapantes de metabolitos reactivos necrogénicos	34
I.7.4	Incremento de las biotransformaciones inactivantes	35
I.7.5	Inhibición de la peroxidación de lípidos	36
I.7.6	Modulación de las etapas tardías del daño hepático inducido químicamente	40

I.8 ANTECEDENTES DEL DITIOTREITOL COMO AGENTE PROTECTOR	42
II. OBJETIVOS	
II.1 OBJETIVO GENERAL	44
II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	45
III. MATERIALES Y METODOS	
III.1 EQUIPOS	46
III.2 DROGAS	47
III.3 SINTESIS Y CARACTERIZACION DEL TETRAACETATO DE DITIOTREITOL	48
III.3.1 Síntesis del DTTAc	48
III.3.2 Caracterización del DTTAc por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (CGL/EM)	49
III.3.3 Síntesis de los derivados trifluoroacetilados del DTT Y DTTox	49
III.3.4 Determinación del coeficiente de partición lípido-agua del DTTAc	50
III.4 ANIMALES Y TRATAMIENTOS	51
III.5 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION SANGUINEA Y HEPATICA DE DTT EN RATAS TRATADAS CON DTTAc	52
III.5.1 Técnica para determinar la concentración de DTT en sangre	52
III.5.2 Técnica para determinar la concentración de DTT hepática	52
III.5.3 Curva de calibración de DTTox trifluoroacetilado	53
III.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DTTAc-TIOLACETATO ESTERASA	54
III.6.1 Preparación del homogenato de tejidos, plasma y sangre entera	54
III.6.2 Aislación de las fracciones subcelulares hepáticas	55
III.6.3 Determinación de proteínas	60

III.6.4	Determinación de la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa	60
III.6.5	Demostración de la hidrólisis enzimática del DTTAc	61
III.6.6	Curva de calibración	62
III.6.7	Expresión de los resultados	63
III.7	ESTUDIOS HISTOLOGICOS Y ENZIMATICOS PARA VERIFICAR SI EL DTTAc ES CAPAZ DE PREVENIR LA NECROSIS HEPATICA EN RATAS INTOXICADAS CON CCl₄	64
III.7.1	Estudios histológicos	64
III.7.2	Determinación de la actividad de isocítrico-deshidrogenasa plasmática	65
III.8	EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON DTTAc EN: - LA CONCENTRACION DEL ¹⁴CCl₄ EN HIGADO DE RATAS - LA UNION COVALENTE DEL ¹⁴CCl₄ A LIPIDOS MICROSOMALES HEPATICOS - LA PEROXIDACION DE LIPIDOS MICROSOMALES INDUCIDA POR CCl₄	67
III.8.1	Determinación de la concentración de ¹⁴ CCl ₄ en hígado	67
III.8.2	Determinación de la unión covalente ¹⁴ CCl ₄ a lípidos microsomales	68
III.8.3	Peroxidación de lípidos microsomales inducida por CCl ₄	69
III.9	DETERMINACION DEL EFECTO DEL DTT EN LA FORMACION DE MALONDIALDEHIDO PRODUCIDO DURANTE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS MICROSOMALES PROVOCADA POR EL CCl₄ IN VITRO	71
III.10	REACCION DEL DTT CON PEROXIDOS ORGANICOS	73
III.11	ANALISIS ESTADISTICO	74
IV.	RESULTADOS	
IV.1	SINTESIS Y CARACTERIZACION DEL TETRAACETATO DE DITIOTREITOL	75
IV.2	DETERMINACION DE LA CONCENTRACION SANGUINEA Y	

HEPÁTICA DE DTT EN RATAS TRATADAS CON DTTAc	80
IV.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DTTAc-TIOLACETATO ESTERASA	82
IV.4 PREVENCIÓN DE LA NECROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCl ₄ CON DTTAc. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS Y MEDIDAS DE ENZIMAS EN PLASMA	86
IV.5 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON DTTAc EN LA CONCENTRACIÓN DE ¹⁴ CCl ₄ EN HIGADO Y EN LA UNIÓN COVALENTE DEL ¹⁴ CCl ₄ A LÍPIDOS MICROSOMALES HEPÁTICOS	94
IV.6 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON DTTAc EN LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS MICROSOMALES INDUCIDA POR CCl ₄	97
IV.7 EFECTO DEL DTT EN LA FORMACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO PRODUCIDO DURANTE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS MICROSOMALES PROVOCADA POR EL CCl ₄ IN VITRO	98
IV.8 REACCIÓN DEL DTT CON PEROXIDOS ORGÁNICOS	100
V. DISCUSIÓN	
V.1 NIVELES SANGUÍNEOS Y HEPÁTICOS DE DTT EN RATAS TRATADAS CON DTTAc. DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DTTAc-TIOLACETATO ESTERASA	101
V.2 PREVENCIÓN DE LA NECROSIS HEPÁTICA CON DTTAc	103
V.3 ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DEL DTTAc	104
V.3.1 Efecto del DTT sobre la unión covalente (UC) del ¹⁴ CCl ₄ a lípidos microsomales	104
V.3.2 Efecto del DTT sobre la peroxidación de lípidos	105

VI.	CONCLUSIONES	107
VII.	BIBLIOGRAFIA	109
	APENDICE	126

INDICE DE FIGURAS

I.1	Vías de biotransformación del CCl ₄	11
I.2	Daño celular por CCl ₄	17
I.3	Proceso de peroxidación de lípidos. Reacciones químicas involucradas	21
I.4	Peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Principales vías de degradación	22
I.5	Descomposición de los hidroperóxidos catalizada por los metales de transición	23
I.6	Mecanismo alternativo para la iniciación de la PL en el cual los radicales libres inducen la formación del O ₂ [•]	25
I.7	Ejemplos de xenobióticos que pueden dar O ₂ [•]	26
I.8	Esquema del camino seguido por un tóxico que produce daño en la célula hepática y necrosis	32
I.9	Diferentes mecanismos protectores contra los productos de la peroxidación de lípidos	37
I.10	Etapas tardías de la acción producida por un compuesto necrogénico y sus metabolitos	41
III.1	Fórmula desarrollada del tetraacetato de ditiotreitól	48
III.2	Esquema de obtención de la fracción microsomal del hígado de rata	55
III.3	Esquema de obtención de la fracción mitocondrial purificada y citosólica del hígado de rata	57
III.4	Esquema de obtención de núcleos purificados del hígado de rata	59
III.5	Reacción para medir la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa	60
III.6	Reacción catalizada por la enzima ICD	66
IV.1	Espectro de ¹ H-RMN del DTTAc	75

IV.2	Espectro de masas del DTTAc	76
IV.3	Cromatograma de corriente iónica total del DTT y DTTTox trifluoroacetilados y DTTAc	77
IV.4	Espectros de masas del a) DTT y del b) trans-DTTTox trifluoroacetilados	78
IV.5	Representación gráfica de la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa en distintos órganos, sangre entera y plasma	83
IV.6	Representación gráfica de la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa en distintas fracciones subcelulares hepáticas	84
IV.7	Observación histológica de un corte de hígado de rata control	88
IV.8	Observación histológica de un corte de hígado de rata tratada con DTTAc	89
IV.9	Observación histológica de un corte de hígado de rata tratada con CCl ₄	90
IV.10	Observación histológica de un corte de hígado de rata tratada con CCl ₄ y DTTAc simultáneamente	91
IV.11	Observación histológica de un corte de hígado de rata tratada con CCl ₄ y DTTAc 3 horas después de la toxina	92
IV.12	Representación gráfica del efecto del pretratamiento con DTTAc en la concentración de ¹⁴ CCl ₄ en hígado de ratas	95
IV.13	Representación gráfica del efecto del pretratamiento con DTTAc en la UC de metabolitos reactivos de ¹⁴ CCl ₄ a lípidos microsomales	95
IV.14	Representación gráfica de la relación entre la UC y la concentración de ¹⁴ CCl ₄ en el hígado de ratas pretratadas con DTTAc	96

INDICE DE TABLAS

I.1	Especies químicas reactivas involucradas en la peroxidación de lípidos	27
I.2	Vías de prevención de la necrosis hepática inducida químicamente	32

III.1	Determinación de la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa	61
III.2	Demostración de la hidrólisis enzimática del DTTAc	62
III.3	Efecto del DTT sobre la formación de TBARS	72
III.4	Reacción del DTT con peróxidos orgánicos	73
IV.1	Niveles en sangre de ditioneitol (DTT)	80
IV.2	Niveles en hígado de ditioneitol (DTT)	81
IV.3	Actividad DTTAc-tiolacetato esterasa en distintos órganos, sangre entera y plasma	82
IV.4	Actividad DTTAc-tiolacetato esterasa en distintas fracciones subcelulares hepáticas	84
IV.5	Efecto de la administración de DTTAc sobre la necrosis hepática inducida por CCl ₄ y la actividad ICD plasmática a 24 horas de la intoxicación	86
IV.6	Efecto del pretratamiento con DTTAc en la concentración de ¹⁴ CCl ₄ en hígado de ratas y en la unión covalente de metabolitos reactivos del ¹⁴ CCl ₄ a lípidos microsomaes hepáticos	94
IV.7	Efecto del pretratamiento con DTTAc en la peroxidación de lípidos microsomaes inducida por CCl ₄	97
IV.8	Efecto del DTT sobre la formación de TBARS durante la peroxidación de lípidos microsomaes producida por el CCl ₄ in vitro	98
IV.9	Efecto del DTT sobre el peróxido de benzoílo	100

I. INTRODUCCION

I.1 GENERALIDADES

El hombre utiliza en la industria, en la agricultura, en el control de las enfermedades y en el hogar un gran número de sustancias químicas. Vivimos rodeados por cantidades crecientes de productos químicos (aditivos de alimentos, plaguicidas, fertilizantes, cosméticos, drogas terapéuticas, etc.), muchos de los cuales son peligrosos para la salud humana y el medio ambiente, incluso en pequeñas cantidades.

Las sustancias químicas llegan al ambiente y al hombre de diversas formas. Los fertilizantes, plaguicidas y herbicidas ingresan en el medio ambiente como resultado de una aplicación directa, otras sustancias lo hacen a través de un proceso de combustión (hidrocarburos policíclicos, dioxinas, etc.) y un tercer grupo aparece como resultado de la manufactura, transporte y consumo de todos los productos de la sociedad moderna.

Una vez que la sustancia química ingresa al medio ambiente, puede ser diluída o concentrada tanto por fuerzas físicas o biológicas (biodegradación o bioacumulación), puede también sufrir cambios químicos, incluyendo la combinación con otras sustancias que pueden modificar su peligrosidad. Además, puede incorporarse a los organismos vivos por distintas vías, en donde se puede transformar, acumular y/o excretar.

I.2 DAÑO CELULAR POR TOXICOS

Se define como tóxico a todo agente capaz de producir un efecto nocivo en un sistema biológico o capaz de dañar severamente su función o de destruir la vida, bajo determinadas condiciones y circunstancias (Klaassen y Doull, 1980).

Las intoxicaciones son la consecuencia del daño celular producido por los tóxicos; entendiendo por daño celular a toda alteración del equilibrio químico-biológico normal de la célula.

Una de las maneras de desentrañar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos involucrados en las reacciones que suceden a nivel celular, cuando la unidad de la estructura viviente es expuesta a un agente químico tóxico, es la de estudiar las interacciones entre las células y un tóxico de estructura molecular simple, evitando así agregar complejidades inherentes al compuesto.

El tetracloruro de carbono (CCl_4), compuesto hepatonecrogénico, presenta dicha condición de simplicidad y permite revelar reacciones celulares complicadas, que quedarían oscurecidas ante las respuestas a los múltiples metabolitos de una sustancia tóxica estructuralmente más compleja.

El motivo de estudiar el CCl_4 actuando sobre las células epiteliales hepáticas, además de ser las más susceptibles, se fundamenta en el concepto de daño celular. Este se definió anteriormente como toda perturbación del equilibrio químico-biológico característico de la célula normal. Por lo tanto, es crítico conocer el funcionamiento normal de la célula para entender su alteración. Es por ello que se elige la célula epitelial hepática, debido a que es la más conocida en su estructura y función.

En consecuencia, el efecto del CCl_4 sobre el hígado constituye lo que se denomina un sistema modelo, para la comprensión de las alteraciones que un agente tóxico puede causar en el hígado y que llevan a la muerte celular. El sistema modelo elegido demuestra ser útil como referencia cuando se trata de extrapolar los resultados observados a otros agentes tóxicos, ya sea actuando sobre el mismo tipo de células u otras células del organismo.

Una vez conocidos los pasos que llevan a la muerte celular es posible, utilizando distintos compuestos con propiedades y características diferentes, interferir con dicha secuencia. De esta forma se lograría desarrollar antídotos y tratamientos contra la

INTRODUCCION

acción del tóxico que pudieran revertir el proceso de daño celular o inhibir en forma parcial o total dicho daño.

Independientemente de estas consideraciones el CCl_4 es un compuesto con cierta relevancia ambiental, puesto que ha sido ampliamente utilizado en la industria como solvente y precursor de otros hidrocarburos halogenados (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US. EPA, 1980, 1983)

I.3 EFECTOS TOXICOS DEL CCl₄ EN EL HOMBRE Y EN ANIMALES DE LABORATORIO

El CCl₄, como en el caso de todos los hidrocarburos clorados alifáticos, tiene acción depresora sobre el sistema nervioso central, la circulación sanguínea y la respiración (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983).

En el caso de las intoxicaciones crónicas se observó aumento de la fragilidad de los glóbulos rojos y anemia. La bioquímica sanguínea se encuentra alterada observándose hipoglucemia, aumento del contenido de ácido láctico y disminución del contenido de albúmina. Existe una alteración marcada en el hepatograma y aumento de enzimas en sangre vinculadas al daño hepático (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983).

Los estudios patológicos en animales revelan particular capacidad del CCl₄ para dañar el hígado y su función. Se produce degeneración grasa y necrosis. La administración repetida de CCl₄ da lugar a cirrosis hepática y en ciertas especies de animales como el ratón produce tumores hepáticos. Se describieron también lesiones de cierta importancia pero mucho menos severas en riñón, adrenales y daños menores en testículos, páncreas, bazo, pulmón, corazón, tracto gastrointestinal, etc. (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983). Sin embargo, el efecto sobre el hígado es siempre el dominante.

En el caso de intoxicaciones humanas fatales con CCl₄ el efecto más notable es sobre riñón y/o hígado. Los efectos en el hígado son similares a los observados en la rata, necrosis e hígado graso (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983).

En términos generales puede considerarse al CCl₄ como un compuesto hepatotóxico y así será analizado en detalle en este trabajo, con particular referencia a la producción de daño, muerte celular hepática y la consecuente necrosis. Se entiende por necrosis a aquellos procesos degradativos que suceden a la muerte celular.

I.4 ABSORCION, DISTRIBUCION Y EXCRECION DEL CCL₄

El CCl₄ se absorbe fácilmente por los pulmones, piel, vía oral y desde todos los sitios de administración parenteral utilizados en estudios experimentales. Ello no resulta extraño, por cuanto se sabe que la velocidad de absorción de los xenobióticos depende fuertemente de la liposolubilidad, puesto que esta propiedad les permite fácilmente atravesar membranas biológicas y el CCl₄ tiene un alto coeficiente de partición sangre/aire y aceite/agua (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983).

Una vez absorbido se distribuye ampliamente en los tejidos, alcanzando mayor concentración en tejido adiposo, cerebro, médula ósea e hígado que en otros órganos. No hay correlación entre la concentración de CCl₄ que se encuentra en un tejido dado y el efecto tóxico del mismo en ese órgano (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983).

Como es de esperar de un tóxico con considerable grado de volatilidad y baja velocidad de metabolización, la mayor parte del CCl₄ se excreta por los pulmones. Por ejemplo, en un estudio en el cual se administró 2 ml/kg oralmente a ratas, se observó que el 80% de la dosis administrada se excretaba por los pulmones dentro de las 10 horas iniciales. En otro estudio se informó que la velocidad de eliminación era de 7,6% por hora en hígado y 2,5% por hora en sangre (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983).

Cantidades de CCl₄ más pequeñas y no especificadas detalladamente también se eliminan por orina y materia fecal (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983).

I.5 CORRELACION ENTRE LOS EFECTOS TOXICOS DEL CCl₄ Y SU BIOTRANSFORMACION

I.5.1 Generalidades

Los efectos tóxicos, agudos y crónicos más destacados del CCl₄, como ya se describieron, se observan en el hígado.

Un punto crucial en el estudio sobre el daño celular hepático por CCl₄ fue comprender que este compuesto, como muchas otras sustancias químicas, debe biotransformarse para llevar a cabo sus efectos.

Varias razones sugieren que la hepatotoxina requiere un proceso de biotransformación. Una razón es la gran susceptibilidad del hígado frente a otros órganos que presentan concentraciones iguales o mayores del tóxico (cerebro o médula ósea y tejido adiposo) sin que se observen en ellos daños equivalentes. Otra, proviene de la observación de que el CCl₄ produce daño preferentemente en la región centrolobulillar hepática a pesar de que se distribuye uniformemente en todo el lobulillo (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983; Slater, 1966; Recknagel, 1967; Recknagel y Glende, 1973; Reynolds y Moslen, 1980a; Castro JA, 1984). Más aún, esa localización centrolobulillar del daño también se mantiene en estudios de hígado perfundido, en los cuales se invierte el flujo de entrada del líquido de perfusión conteniendo el CCl₄, desde la vía portal a la vena central (Slater, 1966). Otra razón importante para pensar que la biotransformación del CCl₄ es necesaria para producir daño, es que el hígado de la rata recién nacida y el de la gallina no son susceptibles al efecto necrogénico del CCl₄, aunque alcancen concentraciones iguales o superiores a las del hígado de rata adulta (Slater, 1966).

En alguna época se pensó que el efecto solvente del CCl₄ era responsable de todas esas acciones, pero bajo esa hipótesis era imposible explicar las observaciones precedentes. Tampoco podría explicarse por qué otros compuestos halogenados, que son tan buenos solventes como el CCl₄, no son equivalentemente necróticos o no tienen efecto alguno. Tal es el caso del cloroformo, el diclorometano o el tetrafluormetano (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Scien-

INTRODUCCION

ces, 1978; US.EPA, 1980, 1983; Slater, 1966; Recknagel, 1967; Recknagel y Glende, 1973; Reynolds y Moslen, 1980a; Castro JA, 1984).

La selectividad de los efectos, independientemente de la concentración local, también se observa a nivel subcelular hepático. Por ejemplo, las alteraciones tempranas en el hepatocito expuesto a CCl_4 se observan en el retículo endoplásmico, a pesar de que el tóxico llega a todas las organelas (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983; Slater, 1966; Recknagel, 1967; Recknagel y Glende, 1973; Reynolds y Moslen, 1980a; Castro JA, 1984).

Por lo tanto, todo indica que debe producirse alguna biotransformación para ejercer su toxicidad. El hígado se dañaría más porque es allí donde ocurre más intensamente su transformación (IARC, 1972, 1979, 1987; Fishbein, 1976; National Academy of Sciences, 1978; US.EPA, 1980, 1983; Slater, 1966; Recknagel, 1967; Recknagel y Glende, 1973; Reynolds y Moslen, 1980a; Castro JA, 1984). En realidad, es ese requerimiento el que hace a este compuesto un tóxico hepático. Esa metabolización es menos intensa en la rata recién nacida y en la gallina, verificándose fundamentalmente en el retículo endoplásmico hepático (Slater, 1966; Recknagel, 1967; Recknagel y Glende, 1973; Reynolds y Moslen, 1980a; Castro JA, 1984; Sasame y col. 1968; Díaz Gómez y col. 1975).

En definitiva, la localización del daño que produce el CCl_4 se corresponde con la ubicación tisular y subcelular de los sistemas enzimáticos responsables de su biotransformación.

La razón de su toxicidad se debe a que, durante su biotransformación, se producen metabolitos que poseen capacidad de reaccionar perjudicialmente con componentes celulares críticos o provocar indirectamente alteraciones nocivas en ellas.

1.5.2 Biotransformación de sustancias extrañas al organismo

Las sustancias extrañas a los seres vivos (xenobióticos) sufren intensas y variadas transformaciones cuando interaccionan con éstos. Como consecuencia de esas interacciones frecuentemente resultan productos de menor toxicidad, pero ocasionalmente se generan especies más reactivas o tóxicas que el compuesto original

INTRODUCCION

(Gram y Gillette, 1971; Castro JA, 1985; Glenn Sipes y Gandolfi, 1986; Castro GD y Castro JA, 1988). El conocimiento de estas biotransformaciones, de las reacciones que pueden ocurrir, de las enzimas involucradas y de la reactividad de los productos formados son un tema básico en toxicología. En efecto, estos conocimientos permiten no sólo entender la localización de los efectos tóxicos, sino además su duración y también predecir otros aún no establecidos.

En el hombre y otros animales, el hígado es el órgano con mayor capacidad global para biotransformar xenobióticos, pero cierta capacidad también existe en otros órganos como riñón, intestino, adrenales, testículo, ovario, piel, placenta, etc. (Castro JA, 1985). La resultante del proceso de biotransformación hepática es transformar xenobióticos liposolubles en otros más polares y por lo tanto más hidrosolubles y fácilmente excretables por los riñones. Ello ocurre a través de una serie de reacciones químicas catalizadas por enzimas que introducen grupos polares en distintas partes de la molécula del xenobiótico. Ese proceso puede ocurrir en dos etapas (Gram y Gillette, 1971; Castro JA, 1985; Glenn Sipes y Gandolfi, 1986; Castro GD y Castro JA, 1988) que se denominan fase I y fase II.

En la primera (fase I) se verifican las reacciones que convierten grupos funcionales determinados en otros nuevos. Por ejemplo, un alcohol se puede transformar en un aldehído, o un éster se hidroliza para dar un ácido y un alcohol, o un resto no polar de un hidrocarburo alifático o aromático se hidroxila para dar un alcohol o un fenol, etc.

De todos los procesos que ocurren en la etapa I, los más conocidos y relevantes al problema toxicológico que aquí se analizan son las biotransformaciones mediadas por la oxidasa de función mixta (MFOS) y que tienen al citocromo P-450 (P-450) como componente fundamental. La MFOS tiene la característica poco habitual de requerir un reductor (NADPH) y un oxidante (O_2) a la vez y posee tres componentes: un fosfolípido (básicamente fosfatidilcolina); el P-450 y la NADPH P-450 reductasa. El P-450 es una hemoproteína que contiene un átomo de hierro en estado reducido por mol y que es capaz de combinarse en su forma reducida con monóxido de carbono para dar una banda de absorción característica a 450 nm, de la cual deriva su nombre (Gram y Gillette, 1971; Castro JA, 1985; Glenn Sipes y Gandolfi, 1986; Castro GD y Castro JA,

INTRODUCCION

1988). Se sabe que la fracción P-450 está constituida por varias isoenzimas, cada una de las cuales ha sido purificada hasta ser homogénea. Este sistema es capaz de procesar una gran variedad de xenobióticos, cuyo único factor común aparente es cierto grado de lipofilia.

Otras enzimas que pueden intervenir en la fase I son la amino oxidasa, que requiere FAD como cofactor; las esterasas y amidasas y las enzimas de óxido-reducción de alcoholes, aldehídos y cetonas como la alcohol dehidrogenasa.

En la segunda etapa (fase II) se verifican las reacciones denominadas de conjugación. En esta fase el organismo se vale de un grupo de enzimas, distintas de las que intervienen en la fase I, que tienen la propiedad de combinar los compuestos extraños al organismo o sus metabolitos provenientes de la etapa I con otras moléculas endógenas de bajo peso molecular. Entre las más importantes se hallan el sulfato, el ácido glucurónico, la glicina, el agua y el grupo metilo. Las reacciones de conjugación se producen sobre un grupo funcional del xenobiótico o de sus metabolitos, por ejemplo, un hidroxilo alcohólico o fenólico, el resto carboxilo de un ácido, un grupo amino, etc. (Gram y Gillette, 1971; Castro JA, 1985; Glenn Sipes y Gandolfi, 1986; Castro GD y Castro JA, 1988).

Es importante la presencia de estas dos etapas, ya que no siempre la biotransformación que ocurre en la etapa I produce la pérdida de la actividad biológica indeseable para el organismo o la suficiente hidrosolubilidad que permita la excreción rápida. Los productos de estas reacciones de conjugación son en general más polares y menos activos biológicamente.

1.5.3 Biotransformación y activación del CCl₄

Hay dos aspectos importantes en la biotransformación del CCl₄. Uno está relacionado con los procesos bioquímicos, la localización celular y los órganos donde esas biotransformaciones ocurren. El otro está referido a qué productos se forman y cuál es su reactividad química.

Respecto a la naturaleza del sistema enzimático microsomal hepático que metaboliza y activa el CCl₄ a metabolitos reactivos (básicamente a •CCl₃) ya en 1967 se anticipó la posibilidad de que tuviese una participación el P-450, debido a los cambios

INTRODUCCION

espectrales característicos que produce el CCl_4 al interaccionar con este citocromo (McLean, 1967a; Castro JA y col. 1968).

En general, el sistema de la MFOS P-450 dependiente cataliza reacciones metabólicas oxidativas y en mucha menor proporción reacciones reductivas. Esta última es la única vía de metabolización para los tetrahalometanos (MacDonald, 1983).

En los años 1972-1973 se demostró que el metabolismo del CCl_4 a CHCl_3 y la bioactivación a $\bullet\text{CCl}_3$ eran procesos reductivos NADPH dependientes y que requerían P-450 y la participación de la P-450 reductasa (Castro JA y Díaz Gómez, 1972; D'Acosta y col. 1972; Castro JA y col. 1972a; 1973a,b; Díaz Gómez y col. 1973; Uehleke y col. 1973). Posteriormente esto fue confirmado mediante sistemas reconstituídos "in vitro" empleando P-450 purificado (Trudell y col. 1982). El proceso de activación del CCl_4 es inducible por fenobarbital y no por 3-metilcolantreno (Slater, 1982; Janzen y col. 1985; Anders y Pohl, 1985).

La isoenzima específica de P-450 involucrada en el proceso de activación es la denominada P-450 II E 1, inducible por etanol (Johansson y col. 1988, González y Gelboni, 1994)

Varios sustratos e inhibidores capaces de interaccionar con el grupo hemo del P-450 pueden inhibir el proceso de activación del CCl_4 . Ejemplos de estos compuestos son el pirazol, la difenil-p-fenilendiamina (DPPD), la cistamina, etc. En tanto, que los sustratos que interactúan con la apoproteína, como por ejemplo la aminopirina, el 2,2-difenilvalerato de N,N-dietilaminoetilo (SKF 525 A), etc. no modifican o incluso aumentan la intensidad de la activación (Castro JA y Díaz Gómez, 1972; D'Acosta y col. 1972; Castro JA y col. 1972a; 1973a,b; Díaz Gómez y col. 1973).

Durante el metabolismo del CCl_4 se han podido detectar productos estables y reactivos. Entre los más estables se pudo demostrar que se producían CO_2 , CHCl_3 , hexacloroetano y monóxido de carbono. (Slater, 1982; Janzen y col. 1985; Anders y Pohl, 1985).

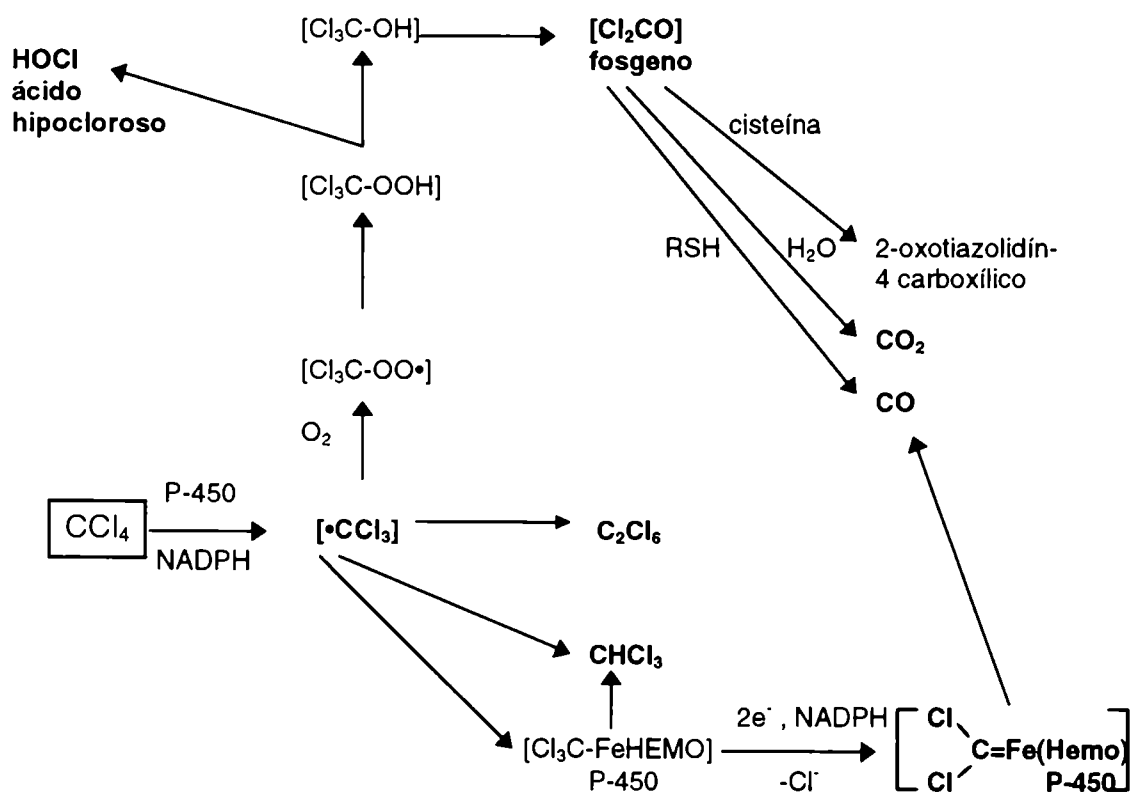
Las especies reactivas que se forman durante la biotransformación del CCl_4 se pudieron establecer mediante distintos métodos, que incluyen "spin trapping", resonancia paramagnética electrónica, estudio estructural de aductos con glutatión,

INTRODUCCION

cisteína y otros aminoácidos. Ellos son el radical libre triclorometilo ($\bullet\text{CCl}_3$), diclorocarbeno ($:\text{CCl}_2$), fosgeno y ácido hipocloroso (Slater, 1982; Janzen y col. 1985; Anders y Pohl, 1985). Todos estos productos reactivos son capaces de reaccionar con componentes celulares y en consecuencia producir efectos indeseables.

Los caminos metabólicos posibles que explican la formación de los productos de biotransformación del CCl_4 pueden verse en la Figura I.1. Existen revisiones bibliográficas específicas en las cuales se puede encontrar mayor detalle sobre los productos de biotransformación de dicho tóxico (Slater, 1982; Janzen y col. 1985; Anders y Pohl, 1985).

Figura I.1
Vías de biotransformación del CCl_4



Están resaltados los metabolitos aislados "in vivo" e "in vitro".

El órgano más activo en su biotransformación es el hígado, pero también se encontró cierta actividad en otros órganos como adrenales, riñón, pulmón, testículo,

INTRODUCCION

placenta, páncreas, etc. (Villarruel y col. 1977; Castro JA y col. 1972b; Toranzo y col. 1978; Castro CR de y col., 1978).

Intracelularmente se ha verificado que la capacidad hepática de bioactivar al CCl_4 es mayor en el retículo endoplásmico liso (REL) que en el rugoso (RER) (Castro JA y col. 1973c) y que la membrana externa nuclear también puede biotransformarlo (Díaz Gómez y Castro JA, 1980a). Existe también una activación mitocondrial hepática del CCl_4 de naturaleza enzimática y otra no enzimática, siendo la primera sólo parcialmente dependiente del citocromo P-450 (Castro CR de y col. 1984; Villarruel y col. 1987). En órganos donde el contenido de P-450 es alto, como es el caso de las glándulas adrenales, la activación del CCl_4 es relevante (tanto en retículo endoplásmico como en mitocondria) (Castro JA y col. 1972b). En general se ha observado que una fracción significativa de la biotransformación del CCl_4 en distintas fracciones subcelulares hepáticas es independiente del P-450 (Castro GD y col. 1989a, 1990).

I.6 DAÑO CELULAR HEPATICO POR CCl₄

I.6.1 Generalidades

Se denomina daño celular, como ya se definió, a toda alteración que aparte a la célula del equilibrio que caracteriza a la homeostasis de la célula normal. El daño celular puede ser reversible o irreversible y compatible con la vida o no. Es reversible cuando la cesación de la exposición a la noxa conduce a un retorno a la condición inicial normal. Es irreversible cuando ese retorno no ocurre. Un daño irreversible no necesariamente es letal. Depende de su naturaleza, intensidad e importancia del componente dañado para la vida celular. En el curso de un daño irreversible puede lograrse un punto de equilibrio homeostático distinto del original, pero compatible con la vida celular.

Una célula está viva cuando es capaz de llevar a cabo por lo menos dos funciones básicas: autorreparar lesiones y duplicarse (este último concepto por supuesto sólo es válido para células que normalmente se duplican). Cuando los daños celulares son tales que superan el umbral más allá del cual la célula indefectiblemente morirá, aún cuando cese su exposición a la noxa, se dice que pasó "el punto de no-retorno". Estos conceptos básicos de la patología celular, que son también puestos en juego cuando la noxa es un agente tóxico, fueron claramente expuestos en distintas revisiones (Trump y col., 1980; Smuckler y James, 1984).

Los metabolitos reactivos principales, responsables de la toxicidad del CCl₄ son los radicales libres triclorometilo ($\bullet\text{CCl}_3$) y triclorometilperoxilo ($\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$) (Slater, 1966; Recknagel, 1967; Recknagel y Glende, 1973; Reynolds y Moslen, 1980a; Castro JA, 1984; Sasame y col., 1968; Díaz Gómez y col., 1975). Ellos interaccionan con componentes celulares mediante las reacciones típicas de los radicales libres, fundamentalmente las de adición y de abstracción de hidrógeno. La ocurrencia de las reacciones de adición se evidenciaron a través de las medidas de unión covalente (UC) (adición de aquellos metabolitos reactivos que contienen el carbono marcado). Por su parte, las reacciones de abstracción de hidrógeno pueden ser estudiadas directamente midiendo la producción de CHCl_3 o a través del análisis de los productos de reacción sobre distintos blancos celulares (bases de ADN, aminoácidos, lípidos, etc). Merece un comentario especial la medición del proceso de peroxidación de lípidos (PL), una

INTRODUCCION

reacción en cadena oxígeno dependiente, iniciada por la abstracción de hidrógeno desde los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

El CCl_4 es capaz de producir daño celular hepático que es evidenciable química y biológicamente y observable por microscopía electrónica e histología (Recknagel, 1967; Slater, 1978; Smuckler, 1968; Smuckler y Arcasoy, 1969). La muerte del hepatocito expuesto a CCl_4 no es instantánea, lleva cierto tiempo para que ocurra. Durante el mismo, se verifican una serie de daños celulares secuenciales y paralelos que la preceden. Entre esos daños hay que discriminar los relevantes a la muerte celular o no y hay que establecer cuáles son causa y cuáles son consecuencia de un efecto anterior. Para desentrañar este complejo proceso de alteraciones observables en el hepatocito después de su exposición al CCl_4 y establecer causas y consecuencias, es útil seguir la secuencia temporal de las alteraciones bioquímicas y estructurales. La idea básica que guía este tipo de enfoque es que una reacción química entre el tóxico y componentes celulares podrá generar una alteración funcional revelable bioquímicamente o por microscopía electrónica. La interacción entre el tóxico y componentes celulares podrá ser la causa de la alteración funcional o estructural sólo si ocurre antes que ella y si se la impide de modo exclusivo, dicha alteración no se produce.

Pocos minutos después de administrar CCl_4 al animal, ej.: rata, ya se observa que ocurren interacciones covalentes de metabolitos reactivos, unión covalente (UC), con los lípidos y proteínas del retículo endoplásmico hepático y peroxidación de sus lípidos (PL) (Castro JA, 1984; Slater, 1978; Reynolds y Moslen, 1980b; Recknagel, 1983; Mitchell y col., 1984; Dianzani, 1987; Klaassen y Plaa, 1969; Castro GD y Castro JA, 1985). La PL se verifica con intensidad máxima entre los 30 y 60 minutos iniciales y cesa a las 3 horas. La mayor parte del proceso total sucede en esa primera hora (Recknagel, 1967; Slater, 1978; Reynolds y Moslen, 1980b; Recknagel, 1983; Mitchell y col., 1984; Dianzani, 1987; Klaassen y Plaa, 1969; Castro GD y Castro JA, 1985). La unión covalente se verifica en su mayor parte en las primeras 6 horas, aunque en este caso es más difícil ser preciso, puesto que la metodología de medición de la UC no permite detectar la fracción de ella que se ha "exportado" del retículo endoplásmico a otras organelas (Villarruel y col., 1987).

INTRODUCCION

Suponiendo que en estas 3 a 6 horas es cuando se verifican los fenómenos químicos más específicos de la acción del CCl_4 , veamos ahora qué alteraciones bioquímicas y ultraestructurales se producen en ese período.

Ya en el intervalo de 1 a 3 horas de administrado el CCl_4 se observa desgranulación del RER y dilatación del REL, RER, membrana perinuclear y aparato de Golgi (Smuckler, 1968; Smuckler y Arcasoy, 1969; Bernacchi y col., 1982), inhibición de la síntesis de proteínas, depresión de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (G6P-ASA) y de la bomba de calcio y disminución del contenido del P-450 y de ATP (Recknagel, 1967; Castro JA y col., 1973b; Bernacchi y col., 1982). Posteriormente se van involucrando las mitocondrias y lisosomas, se acumula calcio (8-10 horas) y finalmente toda la célula se daña; ello es seguido de una estimulación de procesos degradativos y de necrosis visible al microscopio (Smuckler, 1968; Smuckler y Arcasoy, 1969; Villarruel y col. 1987).

La etapa que comprende las primeras 6 horas de la intoxicación es la que llamamos etapa temprana y la que comprende desde las 6 a las 24 horas etapa tardía. Mediante el empleo de antioxidantes como la vitamina E, la prometazina o la DPPD, que inhiben los procesos de PL y no afectan a las UC, y con compuestos como el pirazol y la cistamina que inhiben las UC sin afectar la PL, fue posible visualizar la incidencia relativa de ambos procesos en las alteraciones hepáticas producidas por el CCl_4 "in vivo" (Castro JA, 1984). También se efectuaron estudios equivalentes "in vitro" empleando hepatocitos aislados y los resultados no fueron exactamente iguales (Klaassen y Plaa, 1969). En principio, todos los autores están de acuerdo en que ambos procesos, UC y PL, son responsables de las alteraciones que se observan durante la etapa temprana de la intoxicación. No hay acuerdo, en cambio, sobre la importancia relativa de cada uno.

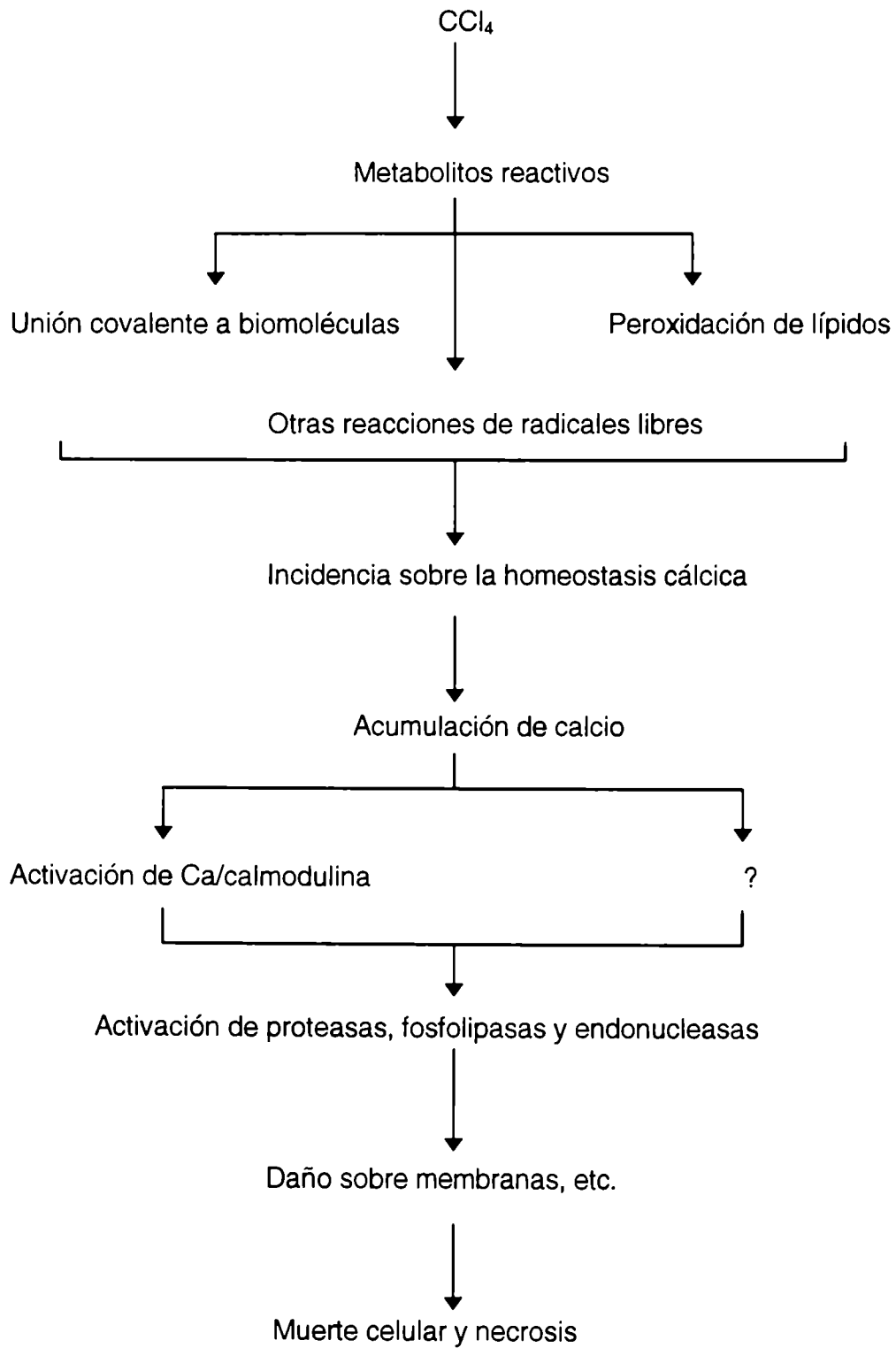
Respecto a la etapa tardía de la intoxicación, también se efectuaron estudios "in vivo" sobre la prevención de la necrosis inducida por CCl_4 empleando quelantes de calcio, anticalmodulinas, inhibidores de procesos de degradación de fosfolípidos y proteínas o agentes capaces de estimular su síntesis (Ferreira y col., 1984a,b, 1985, 1986, 1989; Fernández y col., 1986; Villarruel y col., 1986; Bernacchi y col., 1988; Castro JA, 1990). De todos esos estudios surge la posibilidad de que, en la etapa tardía

INTRODUCCION

del proceso de intoxicación, el daño ocurra como consecuencia de una acumulación intracelular de calcio. Esta acumulación, a través de un mecanismo dependiente de la calmodulina o no, estimula los procesos degradativos de proteínas y fosfolípidos de las membranas celulares, que llevan a la muerte celular y luego a la necrosis. Un esquema que sintetiza el daño celular hepático por CCl₄ se presenta en la Figura 1.2.

Figura I.2

Daño celular por CCl_4



1.6.2 Interacciones de los radicales producidos por biotransformación del CCl₄ con componentes celulares

Los primeros antecedentes acerca de las interacciones de los metabolitos reactivos de CCl₄ con componentes celulares (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) datan de 1966 y 1967 (Castro JA, 1984). Posteriormente fueron estudiados con mayor detalle tanto desde el punto de vista bioquímico como estructural. No obstante, es aún mucho lo que falta por hacer para completar su caracterización.

El caso de los productos de interacción covalente con lípidos es el área en la cual se avanzó más. Por ejemplo, se pudo verificar que la intensidad y la localización (tanto intracelular como en distintos tejidos) de las distintas interacciones con lípidos se corresponde cuali y cuantitativamente con la distribución de la oxidasa de función mixta P-450 dependiente, que activa el CCl₄ a $\bullet\text{CCl}_3$ (Castro JA, 1984).

Las interacciones observadas con los lípidos microsomales hepáticos corresponden fundamentalmente a fosfolípidos, ésteres del colesterol, triglicéridos y ácidos grasos. La mayor parte de la interacción es con los fosfolípidos y dentro de ellos con fosfatidilcolina. No obstante, también hay interacción con lisofosfatidilcolina, esfingomielina y fosfatilglicerol. El ataque de los metabolitos reactivos del CCl₄ se produce sobre los ácidos grasos no saturados de los fosfolípidos y fundamentalmente sobre los polinosaturados (PUFA) (Villarruel y Castro JA, 1973, 1975; Villarruel y col., 1975). Los productos de reacción que pudieron ser aislados son los esperados de una reacción de $\bullet\text{CCl}_3$ con los PUFA (Villarruel y Castro JA, 1975; Villarruel y col., 1975, Link y col., 1984). Alguno de ellos fueron identificados por Trudell y col. (1982) y por Link y col. (1984). También se pudo evidenciar la formación de colesterol triclorometilado durante la intoxicación por CCl₄ (Ansari y col. 1982).

En general, la unión covalente de metabolitos reactivos del CCl₄ a proteínas celulares se correlaciona bien en su distribución tisular y celular, así como su respuesta a inductores e inhibidores, con la de la oxidasa de función mixta P-450 dependiente (Castro JA y Díaz Gómez, 1972; Díaz Gómez y col, 1973). Respecto a cuáles son los aminoácidos involucrados en las interacciones, la información disponible es menos abundante que para el caso de los ácidos grasos. Cessi y col. (1966) sugirieron una

INTRODUCCION

interacción con grupos ϵ -amino de la lisina pero sin ofrecer evidencia alguna de ello. Posteriormente, Reynolds sugirió que todo el ataque ocurre sobre la metionina para dar el sulfóxido (Reynolds, 1967), pero tampoco efectuó demostración estructural. Luego se verificó que los $\bullet\text{CCl}_3$ generados químicamente (catálisis por peróxido de benzoílo) eran capaces de unirse covalentemente con todos los aminoácidos excepto con la glicina, leucina, lisina y metionina (Villarruel y Castro JA, 1980). La reacción es más intensa con cisteína, tirosina y triptofano. Durante los estudios de interacción con metionina, se observó la formación de productos volátiles de descomposición (Villarruel y Castro JA, 1980).

Más recientemente trabajos de nuestro laboratorio lograron establecer las estructuras de numerosos productos de interacción de aminoácidos con $\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ (tirosina, prolina, triptofano, fenilalanina, metionina) (Castro GD y col., 1989b, 1991, 1994a, 1995a; Castro GD y Castro JA, 1995).

En cuanto a las interacciones de los metabolitos reactivos de CCl_4 con ácidos nucleicos, la bibliografía es mucho menos abundante. Los estudios realizados por Rocchi y col., 1973 no arrojaron resultados definidos.

La intensidad de estas interacciones es mucho menor que en el caso de los lípidos o proteínas (Castro GD y col, 1989a; Díaz Gómez y Castro JA, 1980b). Este factor y la dificultad para obtener preparados de nucleicos altamente purificados y libres (o sólo con trazas) de proteínas, hicieron que existieran dudas acerca de si estas interacciones ocurrían o no. Una vez que se obtuvieron preparados de ADN y ARN altamente purificados, se evidenció que existen interacciones de metabolitos de CCl_4 con el ADN pero no con el ARN (Díaz Gómez y Castro JA, 1980b).

Posteriormente se estudió la interacción de los $\bullet\text{CCl}_3$ con ADN y con las cuatro bases que lo componen. Se verificó que la adenina y la guanina eran las bases más afectadas por la interacción, pero que todas las bases reaccionan con mayor o menor intensidad. Se efectuó una separación por cromatografía en columna de los aductos formados y se pudo separar más de 20 aductos diferentes (Díaz Gómez y Castro JA, 1981).

Nuestro laboratorio realizó varios estudios de análisis estructural de los productos de interacción de las bases de ADN y ARN con radicales libres involucrados

INTRODUCCION

en el metabolismo del CCl_4 (timina, citosina, 5-metilcitosina y uracilo) (Castro GD y Castro JA, 1993, 1995; Castro GD y col 1994b,c, 1995b).

Existen también estudios aislados sobre formación de aductos del $\bullet\text{CCl}_3$ con el hemo y sus productos de descomposición provenientes del P-450 microsomal (Fernández y col., 1982) y estudios sobre interacciones covalentes de $\bullet\text{CCl}_3$ con nucleótidos de piridina reducidos (NADH y NADPH) (Kitta y col., 1982). En ninguno de estos dos trabajos se efectuaron los estudios estructurales correspondientes.

Debe tenerse en cuenta que por ser los metabolitos reactivos de CCl_4 principalmente radicales libres, reaccionarán con biomoléculas por mecanismos que no están limitados a la UC o a la PL. De todos modos, son todas reacciones que corresponden a su carácter radical (abstracción de hidrógeno, interacción con oxígeno, etc.). Diversos estudios fueron realizados en nuestro laboratorio para explorar estas reacciones alternativas (Castro GD y col., 1989b, 1991, 1994a,b,c, 1995a,b; Castro GD y Castro JA, 1993, 1995).

I.6.3 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos (PL) es un proceso de degradación oxidativa de los lípidos. Involucra fundamentalmente a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas celulares. Básicamente se identifican tres etapas en este proceso: a) Iniciación; b) Propagación; c) Terminación (Figura I.3).

Figura I.3:

Proceso de peroxidación de lípidos. Reacciones químicas involucradas.

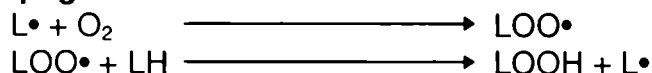
a) Iniciación



X• es un radical libre reactivo

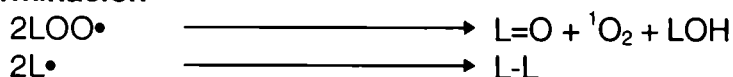
LH representa a una cadena de PUFA dentro de un lípido actuando como un donador de H.

b) Propagación



Los radicales lipoperoxilo también pueden reordenarse a endoperóxidos, que al degradarse generan más radicales libres capaces de iniciar la peroxidación.

c) Terminación

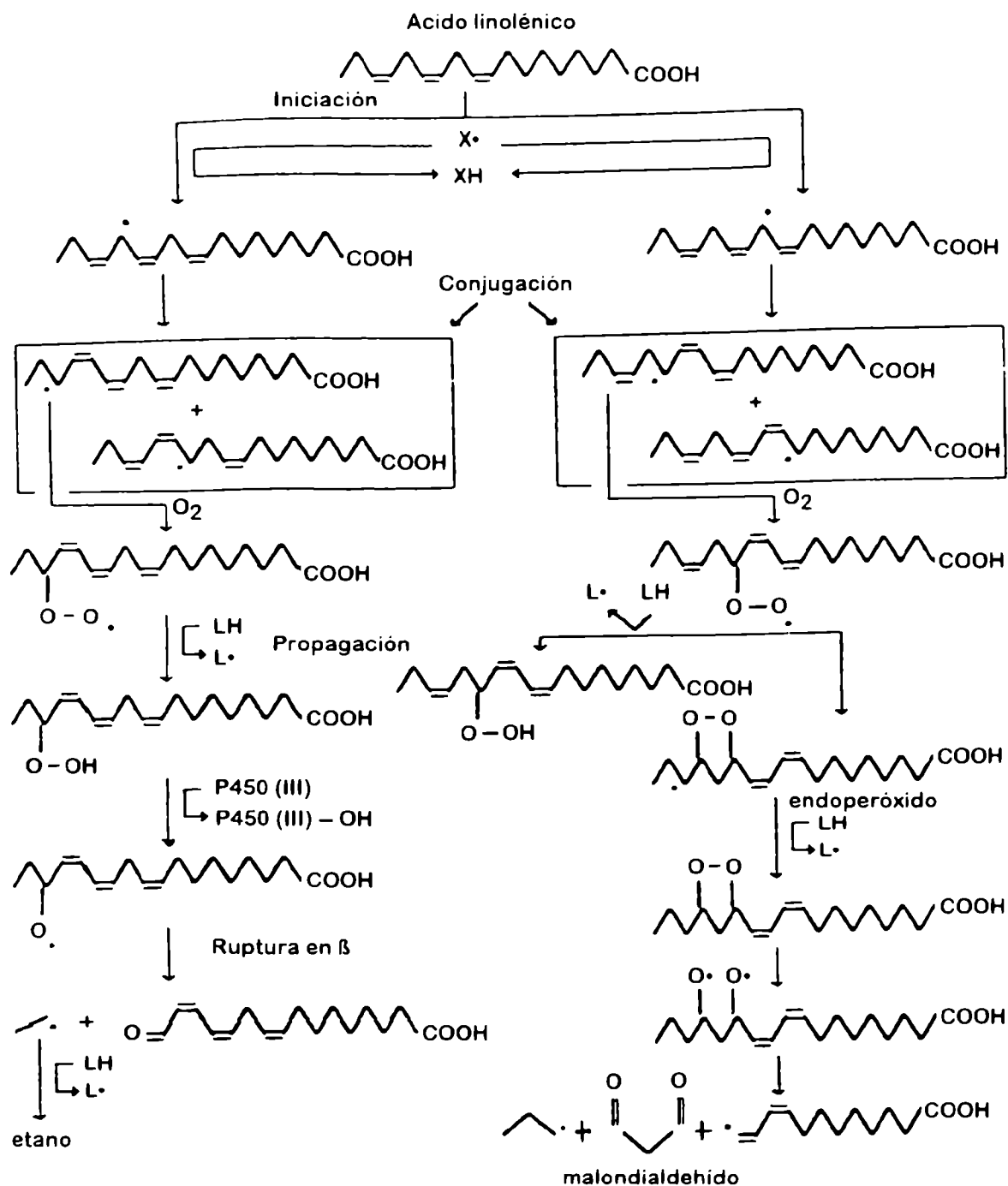


y otras recombinaciones de radicales libres.

En la etapa de iniciación, un radical libre que posea la suficiente energía abstrae un hidrógeno de la molécula de PUFA. Como resultado de esa reacción se genera un radical libre lipídico. Este sufre luego un proceso de reordenamiento de configuración cis-cis a cis-trans que va acompañado de una conjugación de sus dobles enlaces (Figura I.4). El proceso conduce a una mayor absorción en el UV a 234 nm que suele aprovecharse para verificar que la PL está ocurriendo.

Figura I.4

Peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Principales vías de degradación.



En la etapa de propagación se produce la amplificación del efecto. Esto ocurre después que el radical lipídico interaccione con una molécula de oxígeno para dar un radical lipoperoxilo ($\text{LOO}\cdot$). Este radical efectúa otra abstracción de hidrógeno de un PUFA para generar un nuevo radical lipídico que repetirá el proceso. Como resultado

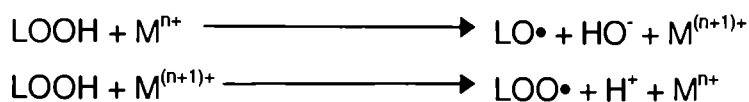
INTRODUCCION

de esa abstracción también se genera un hidroperóxido del lípido en cuestión (LOOH) (Figura I.4) (Frankel, 1982, 1985, 1987; Esterbauer, 1982; Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1985; Horton y Fairhurst, 1987; Kappus, 1987).

Paralelamente, los radicales lipoperoxilo pueden conducir a la formación de endoperóxidos. Esta última vía es la que genera malondialdehído, producto cuya detección da lugar a uno de los métodos más difundidos de medir PL (Figura I.4). También se ha aprovechado que el malondialdehído es capaz de reaccionar con grupos amino de aminoácidos, proteínas, fosfatidiletanolamina, ácidos nucleicos, etc. (compuestos lipofucsínicos) para dar lugar a bases de Schiff, que tienen una fluorescencia característica.

La vía de los hidroperóxidos también continúa hacia una mayor degradación. Es un proceso catalizado por metales de transición (particularmente hierro y cobre) que genera radicales alcohoxilo (LO•) (Figura I.5).

Figura I.5: Descomposición de los hidroperóxidos catalizada por metales de transición



La posterior escisión en β de los alcohoxilos conduce a la formación de radicales libres alquilo. Estos a su vez, generan por abstracción de hidrógeno hidrocarburos volátiles (ej.: etano a partir de linolénico y pentano a partir de araquidónico). La medición de estos hidrocarburos volátiles constituye otro modo adicional de seguir los procesos de PL (Frankel, 1982, 1985, 1987; Esterbauer, 1982; Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1985; Horton y Fairhurst, 1987; Kappus, 1987).

Entre la variedad de reacciones adicionales que ocurren, conviene destacar algunas que fundamentan otros procedimientos para detectar y cuantificar la PL o que se han vinculado con sus efectos tóxicos. Una de ellas es la que genera oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) a partir de la dismutación de radicales lipoperoxilo (Figura I.3). Cuando $^1\text{O}_2$ pasa al estado fundamental emite una luminiscencia característica cuyas bandas a

INTRODUCCION

634 y 703 nm fueron aprovechadas para efectuar mediciones de PL (Frankel, 1982, 1985, 1987; Esterbauer, 1982; Cadenas y Sies, 1984; Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1985; Horton y Fairhurst, 1987; Kappus, 1987).

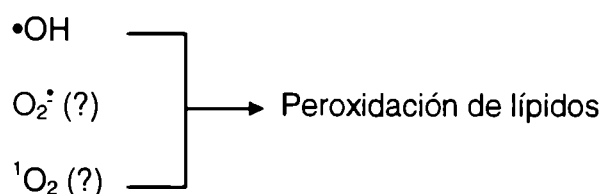
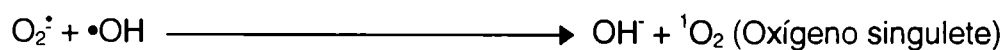
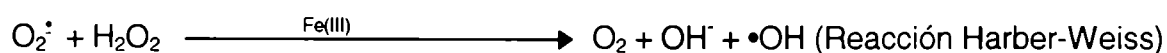
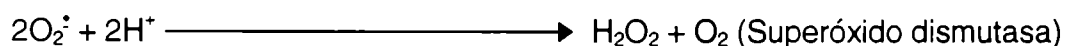
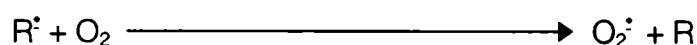
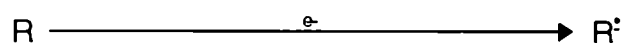
Otras reacciones adicionales son las que conducen a aldehídos y compuestos carbonílicos ($RC=O$). Los más relevantes desde el punto de vista toxicológico son los 4-hidroxi-2-nonenales y entre ellos el 4-hidroxi-2-nonenal, al cual se atribuyen los efectos tóxicos más relevantes de la PL. La determinación de estos aldehídos, previa formación de las correspondientes 2,4-dinitrofenilhidrazonas, también dio lugar a un método para detectar y medir PL (Frankel, 1982, 1985, 1987; Esterbauer, 1982; Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1985; Horton y Fairhurst, 1987; Kappus, 1987).

Finalmente mencionaremos que existe una etapa de terminación, en la cual dos radicales involucrados en el proceso se combinan entre sí para dar un producto no radical (Figura I.3) (Frankel, 1982, 1985, 1987; Esterbauer, 1982; Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1985; Horton y Fairhurst, 1987; Kappus, 1987).

Existe una ruta alternativa para la iniciación de la PL. Esta deriva de la reducción del oxígeno molecular (O_2) a anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por los radicales libres de los compuestos hepatotóxicos. El $O_2^{\cdot-}$ puede reducirse nuevamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y un radical hidroxilo ($HO\cdot$) o puede reaccionar perdiendo un electrón de spin apropiado, produciendo el altamente reactivo 1O_2 (Horton y Fairhurst, 1987; Holtzman, 1982). Estos procesos están descritos en la Figura I.6. El radical hidroxilo ($HO\cdot$) que es muy reactivo puede iniciar la PL (Horton y Fairhurst, 1987; Holtzman, 1982).

Figura I.6

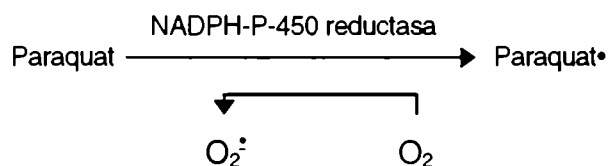
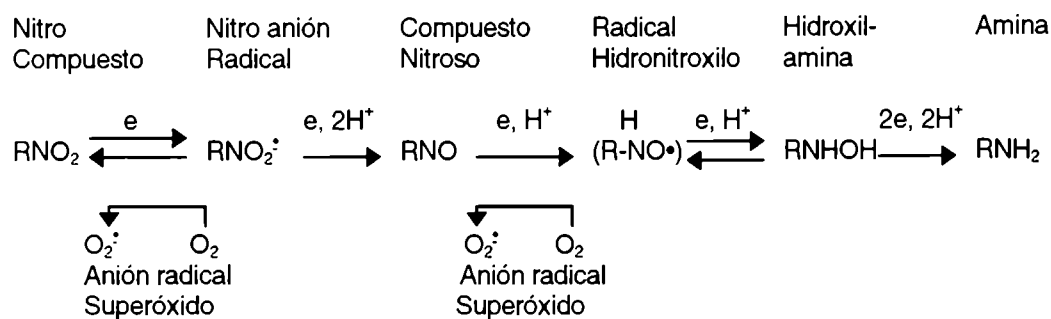
Mecanismo alternativo para la iniciación de la PL en el cual los radicales libres inducen la formación del $O_2^{\cdot -}$



Hay especies químicas que sufren reacciones de óxido- reducción cíclicas e interactúan con O_2 dando el $O_2^{\cdot -}$ que sigue la vía descrita. Ejemplos de compuestos químicos actuando de esta manera alternativa para producir PL, son los nitrofuranos y otros nitroderivados, el paraquat etc. (Horton y Fairhurst, 1987; Holtzman, 1982) (Figura I.7).

Figura I.7

Ejemplos de xenobióticos que pueden dar $O_2^{\cdot -}$



La PL genera durante esa degradación una gran cantidad de productos de menor peso molecular (Frankel, 1982, 1985, 1987; Esterbauer, 1982; Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1985; Horton y Fairhurst, 1987; Kappus, 1987). En la Tabla I.1 se presenta un breve listado de las especies químicas involucradas en la PL.

Tabla I.1

Especies químicas reactivas involucradas en la peroxidación de lípidos

$O_2^{\cdot-}$	Generado en la biotransformación de ciertos xenobióticos por un ciclo redox. No es iniciador "per se" pero puede producir $HO\cdot$ por reacción con H_2O_2 .
H_2O_2	Producto de dismutación de $O_2^{\cdot-}$. En presencia de trazas de hierro se descompone a $HO\cdot$.
$HO\cdot$	Altamente reactivo e iniciador de la peroxidación. Se generaría por descomposición de H_2O_2 (reacción tipo Fenton).
1O_2	Se forma por descomposición de radicales lipoperoxilo, dismutación de $O_2^{\cdot-}$, etc. Iniciador cuantitativamente poco relevante. Reactivo hacia enlaces π .
$[FeO_2]^{2+}$	Iniciador de la peroxidación, importante en aquellos procesos hierro dependientes.
Radicales lipoperoxilo ($LOO\cdot$)	Productos de la reacción de radicales lipídicos con O_2 . Responsables de la propagación de la peroxidación.
Hidroperóxidos ($LOOH$)	Se generan por abstracción de H de los PUFA por el $LOO\cdot$. Se degradan produciendo más radicales libres.
Radicales alcohoxilo ($LO\cdot$)	Proviene de la descomposición de hidroperóxidos catalizada por hierro (III) o cobre (II).
Compuestos carbonílicos ($RC=O$)	Se producen por degradación de hidroperóxidos, etc. Reactivos hacia nucleófilos (aminoácidos, GSH).

Existen revisiones detalladas acerca de la química de la peroxidación de lípidos y los modos de medirla (Frankel, 1982, 1985, 1987; Esterbauer, 1982; Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1985; Horton y Fairhurst, 1987; Kappus, 1987).

I.6.4 Consecuencias de la peroxidación de lípidos

La PL daña seriamente a las membranas biológicas, debido a que los PUFA son componentes críticos de las mismas y responsables de muchas de sus propiedades.

Como consecuencia de la PL se producen en la célula alteraciones estructurales y bioquímicas.

Las alteraciones estructurales observadas en la célula son la pérdida de fluidez de la membrana, la disminución de su potencial, el aumento de la permeabilidad a iones y como consecuencia se produce ruptura y pérdida del contenido de la organela o de la célula. Además, en el retículo endoplásmico se observa despegue de ribosomas, en las mitocondrias swelling y lisis y en los lisosomas lisis con liberación de enzimas degradativas, que también causan la ruptura celular. (Castro GD y Castro JA, 1990).

También se evidencian cambios bioquímicos profundos. Por ejemplo, disminución de la síntesis de proteínas, del contenido de citocromo P-450 e inhibición de enzimas, como la glucosa-6-fosfatasa y la UDP-glucuronil transferasa. En las mitocondrias disminuye el contenido de K y Ca y se produce desacople de la fosforilación oxidativa y en la membrana plasmática aumenta el pasaje de K y Ca y disminuye su capacidad para el transporte de timidina (Slater, 1984; Kappus, 1985; Sevanian y Hoschstein, 1985; Poli y col., 1987; Halliwell y Gutteridge, 1990).

El mecanismo por el cual se producen estas alteraciones, aún no está totalmente aclarado. Una parte del efecto se debería a las perturbaciones que se generan en la membrana, lo cual incluye varios procesos. Por ejemplo, reacciones de terminación entre componentes tales como lípido-lípido, lípido-proteína, formación de alcohoxilo de lípidos, peroxilos de lípidos, etc. que cambiarían la estructura ordenada de la membrana (Slater, 1984; Kappus, 1985; Sevanian y Hoschstein, 1985; Poli y col., 1987; Halliwell y Gutteridge, 1990).

También hay que tener en cuenta, como posible factor de perturbación de la membrana, el que los radicales libres de los PUFA que la constituyen, pueden abstraer H de las proteínas vecinas de la membrana o de sus grupos sulfhidrilos. Este tipo de reacciones conduciría a generar, por ejemplo, puentes disulfuro y uniones lípido-proteína o proteína-proteína con graves consecuencias potenciales (Slater, 1984;

INTRODUCCION

Kappus, 1985; Sevanian y Hoschstein, 1985; Poli y col. 1987; Halliwell y Gutteridge, 1990).

Para explicar los efectos dañinos de la peroxidación, a cierta distancia del sitio de iniciación de la misma, se ha postulado que los hidroxialdehídos producidos durante la PL (como por ejemplo el 4-hidroxi-2-nonenal) pueden migrar del sitio de producción a otras partes de la célula y allí causar daño. Esta hipótesis se basa en que se detectó su presencia lejos del lugar de formación y se estableció su capacidad para reaccionar covalentemente con componentes celulares. Además, varios efectos que los hidroxialdehídos producen sobre las enzimas, son semejantes a los observados durante la PL (Comporti, 1987; Esterbauer y col. 1991).

1.6.5 Estimulación del proceso de peroxidación de lípidos por CCl₄

Después de esta breve introducción sobre la PL y su detección, el siguiente aspecto a considerar es si hay o no evidencia de que el CCl₄ la estimule. Existe abundante bibliografía que documenta la estimulación de la PL por parte del CCl₄ tanto in vivo como in vitro.

Se pudo evidenciar la producción de malondialdehído en preparados microsomales y homogenatos de hígado en condiciones donde había biotransformación de CCl₄. También pudo establecerse que los lípidos microsomales hepáticos de animales intoxicados por CCl₄ presentaban una mayor conjugación de dienos (Slater, 1966; Recknagel, 1967; Recknagel y Glende, 1973; Reynolds y Moslen, 1980a; Castro JA, 1984; Halliwell y Gutteridge, 1985; Poli y col., 1987; Villarruel y col., 1976; Toranzo y Castro JA, 1980).

Se observó un mayor consumo de los PUFA y en particular de ácido araquidónico en los lípidos microsomales de animales intoxicados (Suss y col., 1986). No se evidenció sistemáticamente una mayor fluorescencia derivada de pigmentos lipofucsínicos celulares (Castro JA, 1983). Esto puede deberse a que buena parte del malondialdehído se biotransforma rápidamente (Recknagel, 1967).

Se pudo observar que tanto "in vitro" como "in vivo" el CCl₄ estimula la producción de hidrocarburos volátiles como etano, propano, pentano, etc. (Poli y col., 1987; Villarruel y col., 1976; Toranzo y Castro JA, 1980). La formación de

INTRODUCCION

hidroperóxidos de lípidos fue demostrada por cromatografía gaseosa y por HPLC. Su estructura fue confirmada por espectrometría de masas (Dianzani, 1987). También pudo evidenciarse tanto "in vitro" como "in vivo" que el CCl₄ estimula la emisión de luminiscencia característica del ¹O₂ y la producción de hidroxialquenales, entre ellos el 4-hidroxi-2-nonenal (Halliwell y Gutteridge, 1985).

En resumen, está muy bien documentado que el CCl₄ estimula la PL. Existen revisiones exhaustivas sobre el tema (Slater, 1966; Recknagel, 1967; Recknagel y Glende, 1973; Reynolds y Moslen, 1980a; Castro JA, 1984; Halliwell y Gutteridge, 1985; Poli y col., 1987; Villarruel y col., 1976; Toranzo y Castro JA, 1980).

I.7 PREVENCIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO QUÍMICAMENTE

I.7.1 Generalidades

El hígado es el órgano blanco principal de los efectos necrogénicos de una amplia variedad de tóxicos naturales y sintéticos presentes en el medio ambiente (McLean y Mattocks, 1980; Reynolds y Moslen, 1980b). Debido a ello, se ha hecho un gran esfuerzo dedicado a entender el mecanismo por el cual los tóxicos producen necrosis en las células hepáticas y al desarrollo de agentes antinecróticos (Gillette y col., 1974; Mitchell y col., 1976; Slater, 1978).

Entre otras funciones relevantes del hígado cabe resaltar la capacidad de transformar los xenobióticos lipofílicos en otros productos más polares excretables por vía renal (Parke y Williams, 1969). Esta función, que normalmente es beneficiosa, ocasionalmente genera compuestos más tóxicos que el original. Por esta razón, no es sorprendente que el hepatocito sufra efectos deletéreos debidos a compuestos químicos más frecuentemente que células de otros órganos.

Adicionalmente, el hígado es a menudo un órgano blanco de daño inducido químicamente porque muchas sustancias extrañas ingresan al organismo por la vía oral. Una vez ingeridos, los xenobióticos son absorbidos en el intestino y desde allí, vía portal, llegan al hígado; que queda expuesto inicialmente a altas concentraciones de compuestos tóxicos.

Un diagrama simplificado de cómo los compuestos químicos pueden llegar al órgano blanco donde producirán necrosis celular se observa en la Figura I.8. El bloqueo de los efectos necrogénicos se puede alcanzar interrumpiendo, en cualquiera de sus pasos, la secuencia descrita en la mencionada figura. Es de interés encontrar métodos específicos con los que se pueda bloquear la necrosis hepática inducida químicamente (Tabla I.2).

Figura I.8: Esquema del camino seguido por un tóxico que produce daño en la célula hepática y necrosis

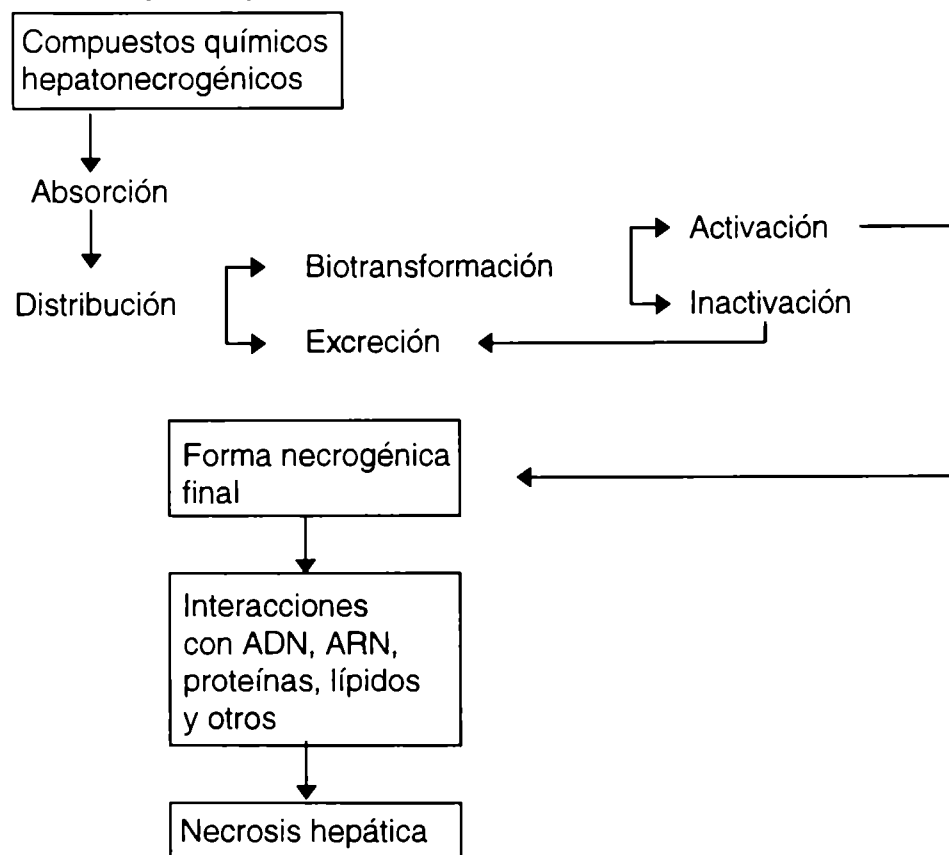


Tabla I.2

Vías de prevención de la necrosis hepática inducida químicamente

I.7.2 Inhibición de la activación metabólica

I.7.3 Agentes químicos atrapantes de metabolitos reactivos necrogénicos

I.7.4 Incremento de las biotransformaciones inactivantes

I.7.5 Inhibición de la peroxidación de lípidos

I.7.6 Modulación de las etapas tardías del daño hepático inducido químicamente

INTRODUCCION

De los aspectos citados en la Tabla I.2, concentraremos la atención en los puntos que están relacionados directamente con la acción preventiva del compuesto estudiado en este trabajo (tetraacetato de ditiotreitolo) sobre el daño hepático inducido por el CCl_4 (I.7.3 y I.7.5).

I.7.2 Inhibición de la activación metabólica

La mayor razón de la susceptibilidad del hígado al daño inducido químicamente es su capacidad de biotransformar algunos xenobióticos a intermediarios reactivos más tóxicos (Fig. I.8). Una consecuencia obvia es que la inhibición de las biotransformaciones activantes deberían prevenir o reducir la necrosis hepática inducida químicamente. El MFOS es responsable de la bioactivación de muchos compuestos necrogénicos a metabolitos reactivos de naturaleza electrofílica o radicales libres (Gillette y col., 1974; Wislocki y col., 1980; Cunnings y Prough, 1983). Los metabolitos reactivos generados presentan diferentes estructuras: radicales libres, iones carbonio, átomos elementales, sulfenos, epóxidos, etc.

La intensidad de los efectos necrogénicos de los xenobióticos depende de:

La intensidad de los procesos de activación.

La reactividad de los productos resultantes de la biotransformación.

La vida media de la biomolécula alterada por el metabolito necrogénico final.

La enzimología de las biotransformaciones mediadas por el P-450 requiere oxígeno molecular y un agente reductor, NADPH y tiene tres componentes: el P-450, NADPH P-450 reductasa y un fosfolípido, principalmente fosfatidilcolina. La intensidad del conjunto de las reacciones activantes mediadas por este sistema puede disminuirse por:

- a) Limitación de la disponibilidad de NADPH.
- b) Disminución de los niveles del P-450, ya sea disminuyendo su síntesis o provocando su destrucción.
- c) Inhibición del P-450 mediante sustratos con los que interacciona con alta afinidad.

- d) Desaceleración de la reducción del P-450 inhibiendo la citocromo P-450 reductasa NADPH-dependiente.

1.7.3 Agentes químicos atrapantes de metabolitos reactivos necrogénicos

Ha sido objeto de estudio la posibilidad de prevenir los efectos necrogénicos inducidos químicamente mediante el uso de agentes atrapantes de metabolitos reactivos necrogénicos. Para llegar a obtener tal protección, el agente atrapante debería alcanzar una concentración razonable en el lugar de formación de las especies reactivas, para poder competir efectivamente con el blanco celular del reactivo intermedio. El rol del agente químico es facilitado considerablemente cuando el metabolito reactivo tiene una vida media larga. En efecto, cuando esto ocurre las posibilidades de que se produzca una interacción entre el metabolito reactivo y el agente protector se ven incrementadas.

Un interesante ejemplo de esta vía de prevención es dada por Mitchell y colaboradores (1973). Estos investigadores postularon que la cistamina y el dimercaprol, los cuales presumiblemente reaccionan con los derivados reactivos del acetaminofeno, disminuyen la unión covalente de esos metabolitos a los constituyentes celulares y consecuentemente la necrosis hepática inducida por este tóxico.

En este punto conviene hacer mención de que un porcentaje no establecido de los efectos protectores del glutatión (GSH) o algunos de sus precursores tales como la cisteína, N-acetilcisteína o 1,2-oxotiazolidina-4-carboxilato sobre el daño hepático inducido químicamente (Mitchell y col., 1982; Meister, 1983) está dado por reacciones no enzimáticas directas con metabolitos reactivos necrogénicos (ej. aldehídos, cetoaldehídos, alquenos o epóxidos) (Jakoby y col., 1976). De hecho, algunos compuestos portadores de un carbono lo suficientemente electrofílico pueden reaccionar con el glutatión y producir un tioéter. Cientos de compuestos químicos de este tipo han sido descritos por Jakoby y col., 1976.

Otros ejemplos de efectos protectores, atribuibles a agentes atrapantes de metabolitos reactivos de un xenobiótico hepatotóxico, se tiene estudiando el daño hepático producido por el CCl₄. El •CCl₃ puede unirse covalentemente, mientras que el radical libre triclorometilperoxilo (CCl₃O₂•) puede ser más crucial en las reacciones de abstracción de hidrógenos sobre los PUFA iniciando así la PL (Slater, 1982). Algunos

INTRODUCCION

agentes bloquean preferentemente la unión covalente, mientras que otros presentan preferencia por el bloqueo de la peroxidación de lípidos. Uno de estos agentes es la prometazina, la cual reacciona relativamente rápido con $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ y lentamente con $\bullet\text{CCl}_3$ (Slater, 1978, 1982). Por otra parte, algunos autores han sugerido que otros factores tales como un retardo en la absorción oral del CCl_4 o una disminución de la temperatura corporal, también pueden jugar un papel importante en los efectos protectores de la prometazina (Nadeau y Marchand, 1973; Ferreyra y col., 1975, Toranzo y col., 1980).

1.7.4 Incremento de las biotransformaciones inactivantes

La inducción enzimática del MFOS (ej. por administración de fenobarbital) puede disminuir los efectos necrogénicos de compuestos químicos que son activados por el P-450. Esta conclusión, aparentemente paradójica, se observó en estudios con dimetilnitrosamina (McLean y Verschuuren, 1969). Este ejemplo ilustra cuan crítico puede ser el balance entre las rutas metabólicas activantes e inactivantes en los efectos necrogénicos resultantes (McLean y Day, 1974).

El ejemplo más representativo de este tipo deriva del conocimiento de las funciones citoprotectoras del glutatión (Meister, 1983; Jakoby y Habig, 1980). Además de las reacciones no enzimáticas del glutatión con intermediarios electrofílicos, ya descritas, este compuesto puede participar en reacciones detoxificantes muy importantes, catalizadas enzimáticamente, como por ejemplo en el bloqueo de la lipoperoxidación.

Un importante grupo de enzimas, que utiliza glutatión como sustrato con funciones detoxificantes, pertenecen a la familia de la glutatión transferasa (Jakoby y Habig, 1980). Estas enzimas catalizan las reacciones en las que el glutatión puede actuar como nucleófilo y en ellas se ve que el sustrato electrofílico se une a la enzima. Ejemplos de estas reacciones catalizadas son la conjugación de glutatión con un átomo electrofílico reactivo, incluyendo el nitrógeno de los nitratos orgánicos o el azufre de los tiocianatos orgánicos (Jakoby y Habig, 1980). Estas enzimas están presentes en la fracción soluble del hígado de varias especies de animales y del hombre (Jakoby y Habig, 1980).

I.7.5 Inhibición de la peroxidación de lípidos

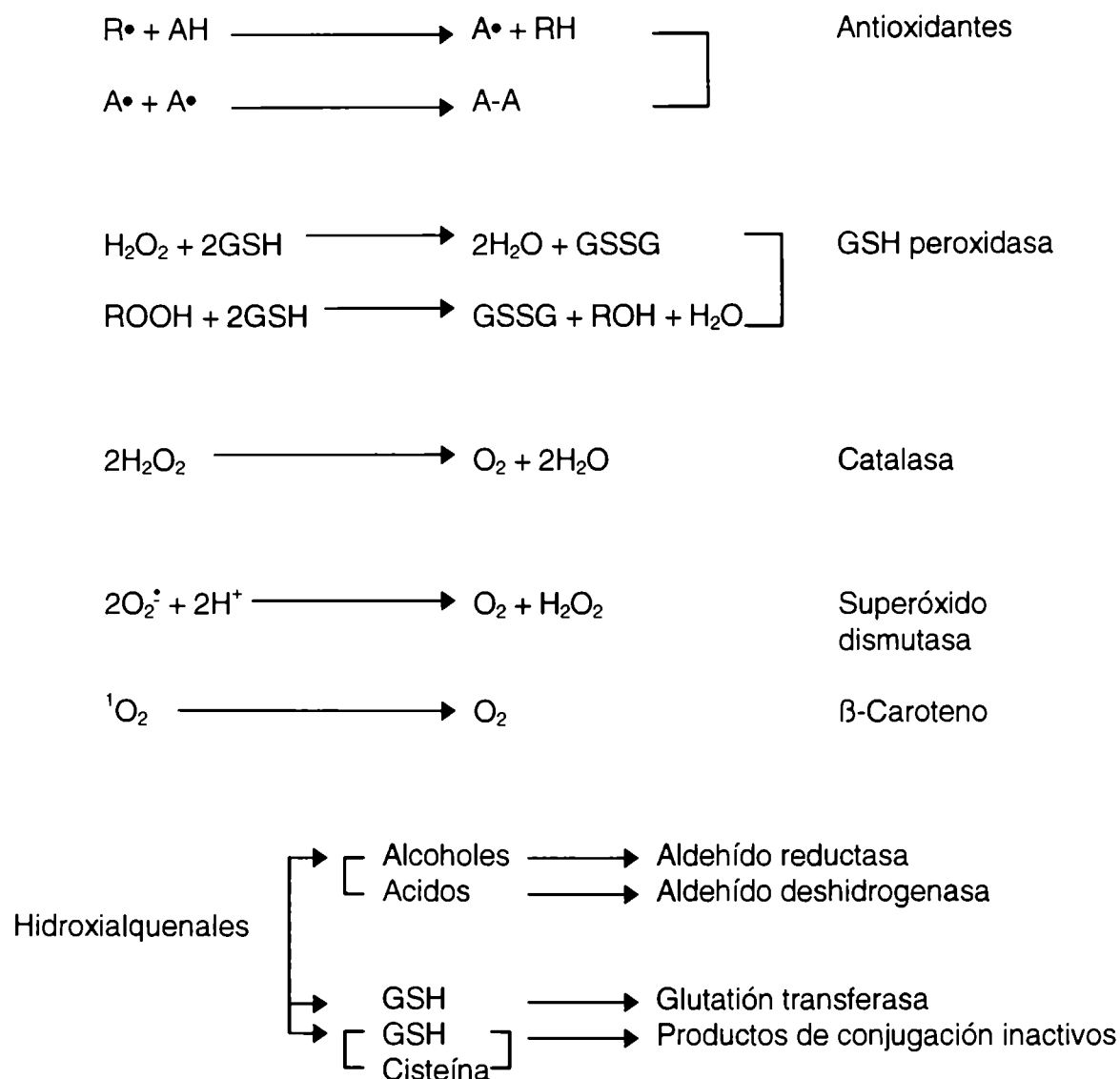
La hipótesis sobre la responsabilidad de la peroxidación de lípidos en el daño celular producido por varios compuestos químicos ha llegado a ser un factor importante (Holtzman, 1982; Pryor, 1982; Kappus y Sies, 1981; Trush y col., 1982; Plaa y Witschi, 1976). Esto lleva a la formación de numerosos productos de descomposición dañinos para la célula, entre los que cabe citar a los peróxidos e hidroperóxidos y aldehídos altamente reactivos tales como malondialdehído y 4-hidroxi-2-nonenal. Pryor (1982) describió varios mecanismos por los cuáles los xenobióticos pueden dar lugar a la formación de radicales libres. Estas especies químicas pueden abstraer hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados, como ocurre en el caso de $\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ producidos por la biotransformación de CCl_4 (Slater, 1982) e iniciar la peroxidación de lípidos.

No es difícil imaginar la potencialidad que tiene el proceso de peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados para provocar extensos trastornos a la estructura altamente ordenada de las membranas celulares, las cuales son ricas en los mismos, con los consecuentes efectos perjudiciales para la integridad de la célula.

La célula posee varios recursos eficientes para hacer frente a la peroxidación de lípidos. Sólo cuando esas defensas son sobrepasadas la peroxidación amenaza la maquinaria celular. Estos mecanismos protectores contra la peroxidación de lípidos están descritos en la Figura I.9.

INTRODUCCION

Figura I.9: Diferentes mecanismos protectores contra los productos de la peroxidación de lípidos.



La primera línea de defensa está constituida por los antioxidantes, los cuales actúan como neutralizantes de los radicales libres, interrumpiendo los mecanismos de reacción en cadena de la peroxidación de lípidos en la etapa de iniciación o propagación. Los radicales libres abstraen hidrógeno de estos antioxidantes en lugar de hacerlo de los PUFA. Naturalmente los antioxidantes pueden ser hidrosolubles

INTRODUCCION

(glutatión reducido, ergotioneína, ácido ascórbico) o liposobles (vitamina E, vitamina A, ubiquinonas).

Otra defensa contra la PL la constituye un grupo de procesos enzimáticos que controlan la formación de radicales libres fuertemente reactivos como los HO•. Vimos que estos pueden producirse a partir de H₂O₂ y O₂[•] en una reacción catalizada por Fe(III) (reacción de Haber-Weiss). Por lo tanto, constituye una defensa contra la formación de HO• y la PL la glutatión peroxidasa (GSH peroxidasa). Esta enzima, que requiere glutatión reducido, descompone el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos de lípido para dar agua y grupos alcohólicos lipídicos respectivamente y glutatión oxidado. Este último es retornado a su forma reducida por la glutatión reductasa, en un proceso NADPH dependiente. En esta vía es preservado el potencial efecto protector del glutatión.

La catalasa también está involucrada en la metabolización del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular. La acción de la catalasa es cooperativa con la de la superóxido dismutasa, que transforma rápidamente el anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La acción concertada de estas dos enzimas previene de la formación de radicales hidroxilos y su subsecuente transformación en oxígeno singulete. Estas dos especies de oxígeno activo son capaces de iniciar la peroxidación de lípidos .

El oxígeno singulete también puede ser eficientemente inactivado por β-caroteno o por α-tocoferol y transformado en oxígeno molecular.

Un grupo de proteínas mantienen ligado al hierro para disminuir su concentración en solución (Frankel, 1982, 1985, 1987; Esterbauer, 1982; Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1985; Horton y Fairhurst, 1987; Kappus, 1987; Slater, 1984; Poly y col., 1987). Son ejemplos la transferrina, la ceruloplasmina y la albúmina.

Para los aldehídos α,β-insaturados, como los hidroxialquenes, pueden darse varios mecanismos de detoxicación. Entre ellos se conocen la reducción a alcoholes u oxidación a los correspondientes ácidos insaturados y la adición a glutatión enzimáticamente catalizadas. En estas reacciones interviene la aldehído/cetona

INTRODUCCION

reductasa (requiere NADPH), la aldehído deshidrogenasa (requiere NAD⁺) y la glutatión transferasa respectivamente.

La reacción química directa con glutatión y cisteína, que son buenos nucleófilos, bloquea por ejemplo a los hidroxialquenos (Schauestein y col., 1977; Esterbauer, 1982).

Una vez conocidos los mecanismos de la peroxidación de lípidos y su control fisiológico, el paso siguiente es cómo se puede usar este conocimiento para la prevención del daño hepático inducido químicamente. Una aplicación obvia de este conocimiento podría ser el prevenir el daño hepático producido por xenobióticos cuyos efectos necrogénicos se piensa que se deban a la peroxidación de lípidos con antioxidantes. Por ejemplo, hay evidencia de que las dosis necrogénicas del CCl₄ estimulan la peroxidación de lípidos en el retículo endoplásmico y varios autores creen que éste es el proceso principal y clave en la necrosis celular hepática (Recknagel, 1983; Slater, 1982).

En línea con esta hipótesis, varios antioxidantes como difenil-p-fenilendiamina (DPPD), prometazina, α -tocoferol, dietilditiocarbamato (DDTC) o glutatión fueron capaces de prevenir la necrosis hepática inducida por el CCl₄ (Castro GD y col., 1986; Rees, 1965; Slater, 1978; Siegers y col., 1978). Sin embargo, ha sido planteado frecuentemente que la mayoría de los antioxidantes presentan otras acciones además de la de inhibir la PL.

La DPPD inhibe la actividad enzimática metabolizante de drogas (Torrielli, 1978), disminuyendo la activación del CCl₄ a \bullet CCl₃ (Ferreyra y col., 1975), e inhibe la síntesis proteica (Torrielli, 1978).

La prometazina retarda la absorción gastrointestinal del CCl₄ y disminuye la temperatura corporal, hechos que pueden explicar, al menos en parte, sus efectos protectores (Nadeau y Marchand, 1973; Slater, 1978).

Además, en el caso de la prometazina (Nayak y Chopra, 1980) y del α -tocoferol (Cawthorne y col., 1970; McLean, 1967b), algunos autores no encontraron ningún efecto protector frente a la necrosis hepática inducida por CCl₄. Así que no está claro si los efectos de varios antioxidantes pueden ser atribuidos solamente a su propiedad de inhibir la peroxidación de lípidos.

INTRODUCCION

El glutatión o sus precursores también deberían ser útiles en casos comprobados de daño hepático atribuible a la PL, dado que es el cofactor de la glutatión peroxidasa necesaria para la destrucción de peróxidos e hidroperóxidos. Sin embargo, no han encontrado que los mismos protejan frente a esos efectos.

Estos ejemplos seleccionados ilustran como el conocimiento de los mecanismos de la PL puede ser usado en la prevención del daño hepático inducido químicamente. Aunque, no está claro hasta qué punto, puede concluirse que los antioxidantes o las manipulaciones que disminuyan la intensidad de la PL resultan frecuentemente efectivos en la prevención del daño hepático inducido químicamente.

I.7.6 Modulación de las etapas tardías del daño hepático inducido químicamente

Existen estudios sobre las posibilidades de actuar en las etapas tardías del proceso, es decir, justo antes del llamado punto de no retorno.

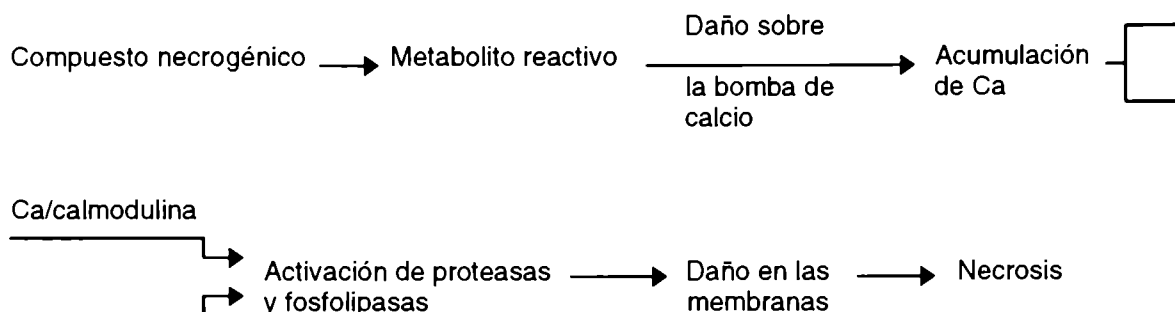
Las etapas tempranas de intoxicación producida por xenobióticos que causan daño hepático usualmente son más específicas que los eventos producidos en etapas más avanzadas. En efecto, las rutas activantes y desactivantes de compuestos químicos tóxicos no son necesariamente semejantes. Además, la naturaleza y consecuentemente la reactividad y selectividad de los metabolitos necrogénicos producidos pueden diferir mucho.

En contraste, en las etapas tardías del daño hepático por tóxicos, puede haber una vía final común de muerte celular que incluye acumulación de calcio (Farber, 1981, 1982) resultando una necrosis independiente de la naturaleza del daño hepático inicial (Farber, 1979, 1982; Orrenius y col., 1983; Trump y col., 1980).

La observación microscópica y las características bioquímicas de la célula en su tránsito a la muerte y necrosis son similares aunque el daño se inicie de manera diferente, por ejemplo, por compuestos químicos, virus, isquemia o anoxia (Trump y col., 1980).

La alteración en la homeostasis cálcica han sido considerados como un fenómeno crítico y letal compartido por estas diferentes condiciones agresivas (Orrenius y col., 1983) y condujo a la hipótesis indicada en la Figura I.10.

Figura I.10: Etapas tardías de la acción producida por un compuesto necrogénico y sus metabolitos



La mencionada hipótesis sugiere que la alteración de la homeostasis cálcica lleva a una acumulación de calcio. El calcio mediado por la calmodulina o por otros mecanismos activa los procesos degradativos de proteínas y fosfolípidos, lo que causa daño en las membranas y necrosis (Castro JA, 1993).

Se identificó un grupo de agentes químicos, que previenen la necrosis hepática inducida por CCl₄, administrados a tiempos donde la necrosis está muy avanzada (Ferreyra y col., 1974, 1977, 1979a,b, 1983a, 1984a; Toranzo y col., 1983; Marzi y col., 1980a,b). Además muchos de ellos fueron efectivos, aplicados en estados tardíos en la prevención de la necrosis producida por otros compuestos tales como dimetilnitrosamina, tioacetamida, bromobenceno o galactosamina (Ferreyra y col., 1979a,b, 1983a,b).

Estos estudios interesan para analizar el mecanismo por el cual los agentes químicos previenen la necrosis hepática inducida químicamente en estados tardíos del proceso; y también constituyen una herramienta útil para contribuir a dilucidar el mecanismo que conduce a la muerte celular y su prevención.

I.8 ANTECEDENTES DEL DITIOITREITOL COMO AGENTE PROTECTOR

Los efectos nocivos de muchas drogas o sustancias químicas ambientales se deben a la formación de especies de oxígeno reactivas y/o a otros radicales libres. Estos compuestos reaccionan con proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otros componentes celulares dañando a las células que no pueden bloquearlos (Halliwell y Gutteridge, 1990; Sies, 1991).

El CCl_4 , que se utilizó como modelo en el presente trabajo, produce daño hepático a través de radicales libres (Slater, 1982; Castro JA, 1984, 1990; Kappus, 1985; Poli y col., 1987; Recknagel y col., 1989). Tales metabolitos reactivos, como se señaló anteriormente, dan lugar principalmente a reacciones de adición y de abstracción de hidrógeno. A través de dichos mecanismos las reacciones adversas más importantes que producen son: interacciones covalentes, interacciones con oxígeno, peroxidación de lípidos, generación de nuevos radicales libres, ruptura de biomoléculas y oxidación de grupos tioles de las proteínas a puentes disulfuro (Brigelius, 1985; Castro JA, 1984, 1990).

Varios trabajos de investigación demostraron que compuestos sulfhidrúlicos, como el glutatión y sus precursores, pueden revertir algunas de las acciones indeseables citadas (Jakoby y col., 1976; Mitchell y col., 1982; Meister, 1983).

En particular, el ditioneitol (DTT) es una sustancia química muy efectiva para reducir puentes disulfuros a tioles "in vitro", porque éste se oxida a un sulfuro cíclico estéricamente favorable (Cleland, 1964; Jocelyn, 1987). En la intoxicación hepática inducida por acetaminofeno, el mecanismo de protección propuesto del DTT se basa en la reducción de uniones disulfuros en enzimas críticas (Harman y Self, 1986).

Existen antecedentes de que el DTT es capaz de inhibir la peroxidación de lípidos y atrapar metabolitos reactivos. (Haenen y col., 1989; Hormann y col., 1989).

El DTT reacciona eficazmente con distintos metabolitos reactivos, inactivándolos. Además de su capacidad de reducir puentes disulfuros, este compuesto puede ejercer una acción protectora mediante otros mecanismos:

a) La donación de hidrógeno a radicales libres provenientes del tóxico o de biomoléculas alteradas. Por ejemplo, en experimentos con un sistema modelo de

INTRODUCCION

generación de $\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ y en presencia de moléculas blanco como citosina, el DTT fue capaz de disminuir o inhibir la formación de aductos de la base. (Mecca y col., 1995). Otro ejemplo, donde el DTT actuaría mediante este mecanismo es cuando se lo utilizó como radioprotector (Falconi y col., 1970).

b) El DTT demostró su capacidad para reaccionar con compuestos carbonílicos α,β -insaturados. Por ejemplo, el 4-hidroxi-2-nonenal resultó eficazmente destruido, presumiblemente por la formación de un aducto con el DTT (Toranzo y Castro, 1995). Muchos autores sugirieron que el 4-hidroxinonenal es el factor clave de los efectos tóxicos de la peroxidación de lípidos (Slater, 1982; Benedetti y col., 1980; Esterbauer y col., 1991; Dianzani, 1992) y que su acción deletérea se debería a que puede interactuar con grupos sulfhidrilos críticos de las proteínas. Otro ejemplo, es la acción protectora del DTT sobre la toxicidad del alcohol alílico en hepatocitos aislados. En esta intoxicación el DTT atrapó al metabolito reactivo, la acroleína, impidiendo que ésta reaccione con los grupos sulfhidrilos de las proteínas (Hormann y col. 1989).

Por lo tanto, el DTT podría emplearse en el tratamiento de las alteraciones producidas por los radicales libres "in vivo", pero presenta varios inconvenientes que deben tratarse de resolver o minimizar. Los mismos son:

- a) El DTT es muy inestable químicamente, porque se oxida con facilidad y,
- b) no es adecuado administrarlo directamente a los animales por su fuerte toxicidad, ya que como otros compuestos sulfhidrílicos es capaz de quelar metales (Weatherall, 1949; Held y Melder, 1987; Jocelyn, 1972; Warenycia y col., 1990).

Debido a que tanto las propiedades beneficiosas como las indeseables del DTT están relacionadas con la presencia de grupos SH libres en su molécula, se pensó en tratar a los animales con ésteres S-acilados de DTT que lo liberen in vivo. Además se sabe que dichos ésteres son menos tóxicos que el DTT (Weatherall, 1949). Ello implica establecer si ocurre su hidrólisis "in vivo". Esta posibilidad requiere de la presencia en el organismo de enzimas que hidrolicen uniones S-acil éster. Enzimas capaces de catalizar estas reacciones hidrolíticas se describieron para otros compuestos S-acilados (Metrione, 1972; Kurooka y col., 1976; Heymann, 1980), por lo tanto también es posible que existan para los ésteres S-acilados del DTT.

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar un compuesto químicamente más estable y menos tóxico que el DTT. Estas condiciones las reúne el tetraacetato de ditiotreitól (DTTAc).

Luego, verificar si es factible generar DTT in vivo a partir del DTTAc y estudiar si el producto de hidrólisis es capaz de bloquear la toxicidad del CCl_4 .

II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

a) Realizar la síntesis del tetraacetato de ditioneitol (DTTAc) y proceder a su caracterización por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN) y espectrometría de masas (EM). Establecer su grado de pureza.

b) Determinar si el DTTAc es capaz de generar DTT in vivo midiendo su concentración en sangre y en tejido hepático.

c) Establecer si en distintos órganos y en sangre existen o no enzimas (DTTAc-tiolacetato esterasas) capaces de efectuar la hidrólisis de DTTAc a DTT. En el caso del órgano de mayor interés en este trabajo (el hígado) se verificará la distribución intracelular de la DTTAc-tiolacetato esterasa (DTTAc-Est).

d) Estudiar la potencial capacidad del DTTAc para prevenir significativamente la necrosis hepática en ratas intoxicadas con CCl_4 . Para ello el DTTAc se administra a varios tiempos después de la intoxicación, se evalúa el grado de necrosis por examinación histológica y se mide la actividad de isocítrico-deshidrogenasa.

e) En el caso de encontrar que el DTTAc tiene alguna acción protectora contra el efecto necrótico hepático del CCl_4 , realizar los estudios mecanísticos correspondientes. Estos contribuirían a verificar si la protección se debe a la capacidad del eventual metabolito del DTTAc, el DTT, de interferir con los procesos dañinos mediados por los radicales libres, que genera el CCl_4 y la peroxidación de lípidos que éste desencadena.

III. MATERIALES Y METODOS

III.1 EQUIPOS

Agitador de tubos tipo Vortex

Baño termostático Dubnoff

Celdas de microdifusión de Conway

Centrífugas

Columnas Extrelut®-20 Merck

Contador de centelleo líquido modelo Rackbeta 1214, Pharmacia Wallac Oy

Cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 con detector selectivo de masas

Hewlett Packard modelo 5970 B

Espectrofotómetro

Evaporador rotativo al vacío

Fotomicroscopio II Carl-Zeiss

Guillotina Harvard

Homogenizador de teflón-vidrio Potter-Elvehjem

pHmetro

Resonancia magnética nuclear

III.2 DROGAS

$^{14}\text{CCl}_4$, de New England Nuclear Corp., Boston, MA, USA. Actividad específica: 4,5 mCi/mmol, pureza del 99% (CGL).

Los experimentos en donde fue utilizado se realizaron dentro de los seis meses siguientes al análisis. La velocidad de descomposición radiolítica es menor del 1% en 18 meses conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En nuestro laboratorio fue almacenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad. Consecuentemente la radiólisis del producto en este lapso no fue significativa.

CCl_4 con bajo contenido de azufre, Mallinkrodt, USA.

d,l-ditiotreitol (reactivo de Cleland; d,l-DTT), Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA.

El resto de los compuestos químicos que se emplearon, detallados en cada uno de los métodos son calidad "para análisis".

III.3 SINTESIS Y CARACTERIZACION DEL TETRAACETATO DE DITIOTREITOL

El primer paso del trabajo fue la síntesis e identificación del tetraacetato de ditiotreitól (DTTAc). La caracterización del mismo se realizó por resonancia magnética nuclear (^1H -RMN) operando a 100 MHz y por cromatografía gaseosa - espectrometría de masas (CGL/EM). También se investigó en las muestras de DTTAc la presencia de ditiotreitól (DTT) y ditiotreitól oxidado (DTTox).

III.3.1 Síntesis del DTTAc

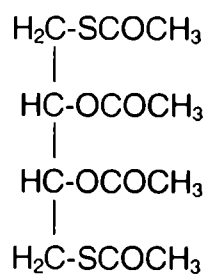
El DTTAc (Figura III.1) se sintetizó por acetilación de d,l-DTT con una mezcla de anhídrido acético: piridina, en la proporción 1:1 (v/v). La misma se realizó en ampollas selladas bajo atmósfera de nitrógeno, necesaria para evitar la oxidación del DTT.

La acetilación se realizó con 100 mg (650 milimoles) de d,l-DTT en 10 ml de anhídrido acético: piridina, a una temperatura de 70°C durante 1 hora.

Luego se evaporó bajo vacío en un evaporador rotativo calentando en un baño maría a 70 °C. El residuo sólido se recrystalizó dos veces de n-heptano.

Se probó la solubilidad del DTTAc en distintos solventes.

Fig. III.1 Fórmula desarrollada del tetraacetato de ditiotreitól



III.3.2 Caracterización del DTTAc por cromatografía gaseosa - espectrometría de masas (CGL/EM)

Las condiciones del análisis se detallan a continuación:

Volúmen de inyección: 1 µl sin división de flujo (splitless)

Temperatura del inyector: 250 °C

Columna: capilar de sílica (25 m x 0.32 mm di) entrecruzada con 5% de fenilmetilsilicona.

Gas carrier: Helio, 40 kPa

Temperatura del horno: desde 90 °C hasta 280 °C con un gradiente de 10 °C por minuto

Temperatura de la interfase CGL/EM: 280 °C

El espectro de masas se realizó a 70 eV.

III.3.3 Síntesis de los derivados trifluoroacetilados del DTT y DTTox

Con el objeto de verificar una eventual contaminación del DTTAc sintetizado con DTT y/o DTTox una porción del sólido recristalizado se derivatizó con anhídrido trifluoroacético (medio en el cual el DTTAc es estable) y se analizó por CGL/EM en las condiciones descriptas en III.3.2.

La derivatización se realizó con anhídrido trifluoroacético en acetato de etilo. Se hizo reaccionar 1 mg de d,l-DTT, DTTox, DTTAc o una mezcla de los tres con 1 ml del anhídrido y acetato de etilo en la proporción 1:1 v/v en ampollas de vidrio de 2 ml, selladas bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los compuestos. Luego se calentó a 110 °C durante 30 minutos.

Se enfrió y lavó 2 veces con 1 ml de agua destilada; esta operación se realizó entre 0 - 4 °C para evitar posibles proyecciones del anhídrido trifluoroacético. Finalmente se cromatografiaron.

Las condiciones cromatográficas señaladas en el ítem III.3.2 permitieron resolver la mezcla DTTAc y los derivados trifluoroacetilados del DTT y DTTox.

III.3.4 Determinación del coeficiente de partición lípido-agua del DTTAc

Se probó la distribución del DTTAc en una mezcla HCCl_3 : buffer Tris/HCl 0.15 M (pH 7.4), 1:1 v/v. Para ello, se agitaron 10 ml de la solución orgánica de la droga (400 $\mu\text{g/ml}$ de HCCl_3 con 10 ml de la fase acuosa durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Ambas fases se analizaron por CGL/EM en las condiciones descriptas en III.3.2 y se compararon con una curva de calibración del DTTAc.

III.4 ANIMALES Y TRATAMIENTOS

En los experimentos se usaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (220-270 g) con un ayuno previo de 12 a 14 h. El agua se administró "ad libitum".

Los animales se criaron en condiciones controladas. La temperatura del bioterio fue de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa estaba entre 45-65%. La luz en el bioterio estuvo encendida entre las 6 am hasta las 6 pm.

El número de animales empleados por grupo se detalla en cada experimento.

El DTTAc se administró siempre intraperitonealmente (ip) en una única dosis de 200 mg/kg suspendida en carboximetilcelulosa (CMC) al 1% en solución salina (NaCl 0,9%); de manera de suministrar 5 ml de la misma por kg. La suspensión de 40 mg/ml y 1% de CMC en solución salina se homogeneizó en un homogeneizador Potter-Elvehjem para asegurar una fina dispersión de las partículas.

Los animales fueron intoxicados recibiendo 1 ml de CCl_4 /kg de una solución 20% (v/v) en aceite de oliva o 0,25 ml de $^{14}\text{CCl}_4$ /kg de una solución al 5% (v/v) en aceite de oliva (12×10^6 dpm/ml). Siempre se administró 5 ml de las citadas soluciones por kg, intraperitonealmente.

Las ratas control recibieron cantidades equivalentes de solución 1% de CMC en solución salina y de aceite de oliva en lugar de DTTAc y CCl_4 respectivamente.

Cuando fue necesario, los animales se sacrificaron por decapitación empleando una guillotina Harvard a diferentes tiempos después del tratamiento. Los hígados y otros órganos se extrajeron y procesaron rápidamente.

Cuando se tomaron muestras de sangre, los animales se mantuvieron bajo anestesia con éter etílico y la sangre se extrajo de la vena cava inferior con jeringa heparinizada.

Todos los tejidos se procesaron entre 0 y 4°C .

III.5 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION SANGUINEA Y HEPATICA DE DTT EN RATAS TRATADAS CON DTTAc

Para determinar el DTT en sangre y en hígado de ratas tratadas se administró 200 mg/kg, ip, de la droga a los animales. Se los sacrificaron a 1 y 2 horas para obtener las muestras de sangre y a los 30 y 60 minutos después de la inyección para medir los niveles del compuesto en hígado

III.5.1 Técnica para determinar la concentración de DTT en sangre

Se mezclaron 4 ml de sangre entera heparinizada con 15 ml de agua destilada más 1 ml de HCl 1N. Después de 10 min la mezcla se pasó a través de una columna Extrelut®-20 y se eluyó con 40 ml de CH₂Cl₂.

El eluato se evaporó hasta casi sequedad en un evaporador rotativo al vacío y el residuo se trasvasó a ampollas de vidrio de 2 ml.

Se derivatizó con 1 ml de anhídrido trifluoroacético: acetato de etilo (1:1 v/v) para determinar DTTox. Es importante hacer notar que el procedimiento de clean up por la columna Extrelut® impide la determinación del DTT como tal, aún en un sistema puro, porque el simple pasaje del DTT a través de la columna lo convierte en DTTox. Por lo tanto la técnica desarrollada permite determinar el DTTAc y evaluar sus posibles metabolitos (DTT y DTTox) como DTTox.

Las muestras se analizaron por CGL/EM operando con monitoreo selectivo de iones (modo SIM) en las condiciones especificadas en el punto III.3.2.

III.5.2 Técnica para determinar la concentración de DTT hepática

El tejido hepático de ratas tratadas con DTTAc se homogeneizó en una solución de sacarosa 0,3 M y EDTA 3 mM (para impedir la probable peroxidación de lípidos), en la proporción de 2 ml por gramo de tejido. Se tomaron 15 ml y se mezclaron con 13,5 ml de agua destilada y 1,5 ml de HCl 0,1N. Luego de 10 min se centrifugaron a 900 x g durante 5 min.

El sobrenadante del centrifugado (20 ml) se adicionó a una columna Extrelut®-20. Se realizó una aspiración en el extremo inferior de la columna para forzar que la solución se reparta rápidamente sobre la misma. Seguidamente se añadió 40 ml de diclorometano.

Se procedió con el eluato de la misma manera que con el de sangre.

III.5.3 Curva de calibración de DTTox trifluoroacetilado

Para la cuantificación se realizó una curva de calibración midiendo el área de los picos del cromatograma.

Se trabajó en un rango de concentraciones de 0,025-0,5 mg/ml de DTTox para lo cual se preparó una solución patrón de DTTox de 1 mg/ml en acetato de etilo. Se derivatizaron 25, 50, 100 y 500 µg de DTTox según el punto III.3.3. Cada concentración se realizó por triplicado.

III.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DTTAc-TIOLACETATO ESTERASA

Para determinar si el DTTAc puede transformarse en DTT in vivo se midió la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa (DTTAc-Est) en distintos órganos, plasma, sangre entera y en diferentes fracciones subcelulares hepáticas.

III.6.1 Preparación del homogenato de tejidos, plasma y sangre entera

Los órganos estudiados fueron: hígado, intestino delgado, páncreas, testículo, riñón, cerebro, glándulas suprarrenales, médula ósea, colon, pulmones y corazón.

Las suspensiones de tejido se prepararon por homogenización de cada órgano en buffer sacarosa 0,25 M/ Tris 2 mM/HCl, pH 7,6; en la relación de 4 volúmenes/g de tejido.

El intestino delgado se aisló de la primera porción del tracto intestinal y se lavó con solución fisiológica (NaCl 0,9%). El colon se lavó de manera similar. La médula ósea se extrajo del fémur con jeringa.

Los homogenatos se diluyeron con el buffer mencionado de manera de utilizar 50 µl para medir la actividad tiol-esterasa y caer en el rango de linealidad de la medición.

Las diluciones realizadas fueron: 1 en 10 para los homogenatos de hígado, intestino delgado y páncreas; 1 en 4 para los de riñón y colon y al medio en los casos de pulmón y corazón. La sangre entera se diluyó 1 en 20 con agua destilada. Los demás homogenatos se emplearon sin diluir.

Las muestras de plasma se obtuvieron por centrifugación de sangre entera heparinizada y se emplearon 100 µl para medir la actividad enzimática.

Todas las operaciones se realizaron entre 0-4°C.

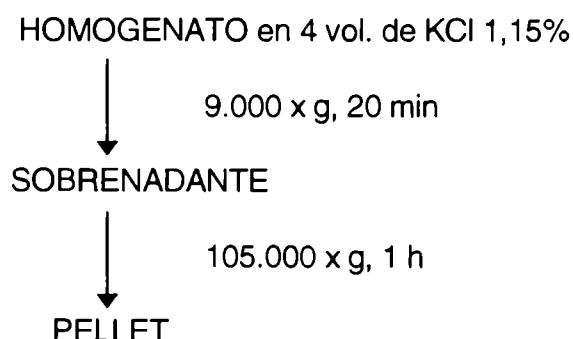
III.6.2 Aislación de las fracciones subcelulares hepáticas

Los homogenatos de hígado se separaron en cuatro fracciones: microsomal, mitocondrial, citosólica y núcleos. La obtención de las mismas se detallan a continuación y todos los procesos se llevaron a cabo entre 0-4°C.

Fracción microsomal

Se procedió según Masana y col., 1984. Los hígados se homogeneizaron con 4 volúmenes de KCl 1,15% . Los homogenatos se centrifugaron durante 20 min a 9.000 x g y el sobrenadante se centrifugó nuevamente 1 h a 105.000 x g para obtener los pellets de microsomas (Fig. III.2). Estos se suspendieron en 10 ml del buffer sacarosa/ Tris/HCl, pH 7,6 y se emplearon 5 µl para medir la actividad DTTAc-Est.

Fig. III.2: Esquema de obtención de la fracción microsomal del hígado de rata.



Fracción mitocondrial

Las fracciones mitocondriales altamente purificadas se prepararon según Sacchi y col., 1971 y Castro CR de y col., 1984. Los hígados se homogeneizaron con 4 volúmenes de sacarosa 0,25 M/ Tris 2 mM/HCl, pH 7,6. El homogenato se centrifugó durante 15 min a 800 x g. El precipitado se descartó. El sobrenadante se centrifugó nuevamente 15 min a 800 x g y el precipitado también se descartó. El sobrenadante se centrifugó durante 15 min a 3.000 x g, separando el sobrenadante para obtener la fracción citosólica y continuando con el pellet para aislar la fracción mitocondrial. Este último se resuspendió con 10 volúmenes del medio de homogeneización y se centrifugó durante 15 min a 3.000 x g. El pellet resultante fue la preparación mitocondrial (Fig.

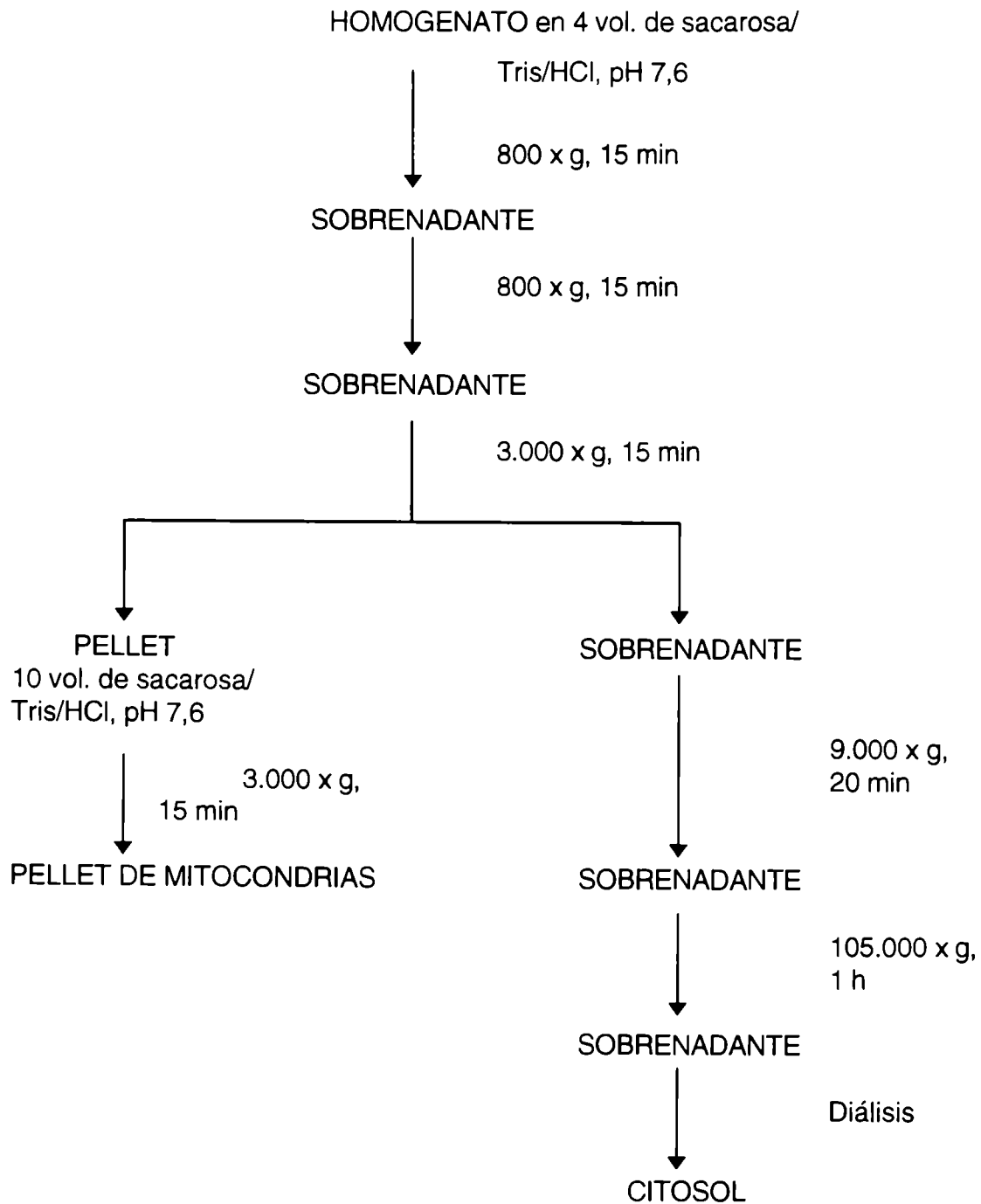
MATERIALES Y METODOS

III.3) utilizada, que se resuspendió en 2 ml del buffer sacarosa/ Tris/HCl, pH 7,6. Se utilizaron 50 µl para medir la actividad enzimática.

Fracción citosólica

El primer sobrenadante de 3.000 x g, reservado para obtener la fracción citosólica, se centrifugó a 9.000 x g durante 20 min. El pellet se descartó y el sobrenadante se centrifugó 1 h a 105.000 x g. El pellet se vuelve a descartar y el sobrenadante se dializó toda la noche en una cámara fría (10-12°C) contra 2 l de buffer sacarosa 0,25 M/ Tris 20 mM/ EDTA 5 mM/HCl, pH 7,4 (Fig. III.3), según Masana y col., 1984. Se emplearon 100 µl de la fracción citosólica para determinar la actividad enzimática.

Figura III.3: Esquema de obtención de la fracción mitocondrial purificada y citosólica del hígado de rata.



Núcleos Purificados

Los núcleos purificados se obtuvieron de acuerdo a Viviani y col., 1978. El hígado entero se lavó dos veces con sacarosa 0,25 M en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5/ KCl 2,5 mM/ MgCl₂ 5 mM (STKM 0,25 M). Se homogeneizó con 3 volúmenes de STKM 0,25 M con la ayuda de un homogeneizador de teflón/vidrio tipo Potter-Elvehjem. El homogenato se filtró a través de una tela de nylon (100 mesh) y centrifugó a 2000 x g durante 20 minutos.

El pellet se lavó 2 veces con STKM 0,25 M centrifugando cada vez a 1000 x g durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en 32 ml de STKM 2,2 M y se depositó sobre un colchón de 4,5 ml de STKM 2,3 M (gradiente discontinuo). Luego se realizó una ultracentrifugación a 80.000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante se descartó. El interior del tubo se limpió cuidadosamente con hisopos de gasa y enjuagó con 5 ml de STKM 0,25 M sin suspender el pellet, limpiándolo después nuevamente.

El pellet, suspendido en 11 ml de STKM 0,25 M, se mezcló con 22,5 ml de STKM 2,2 M y homogeneizó para depositarlo sobre un colchón de 4,5 ml de STKM 2,3 M. Se repitió la ultracentrifugación descartando el sobrenadante y limpiando el tubo como antes.

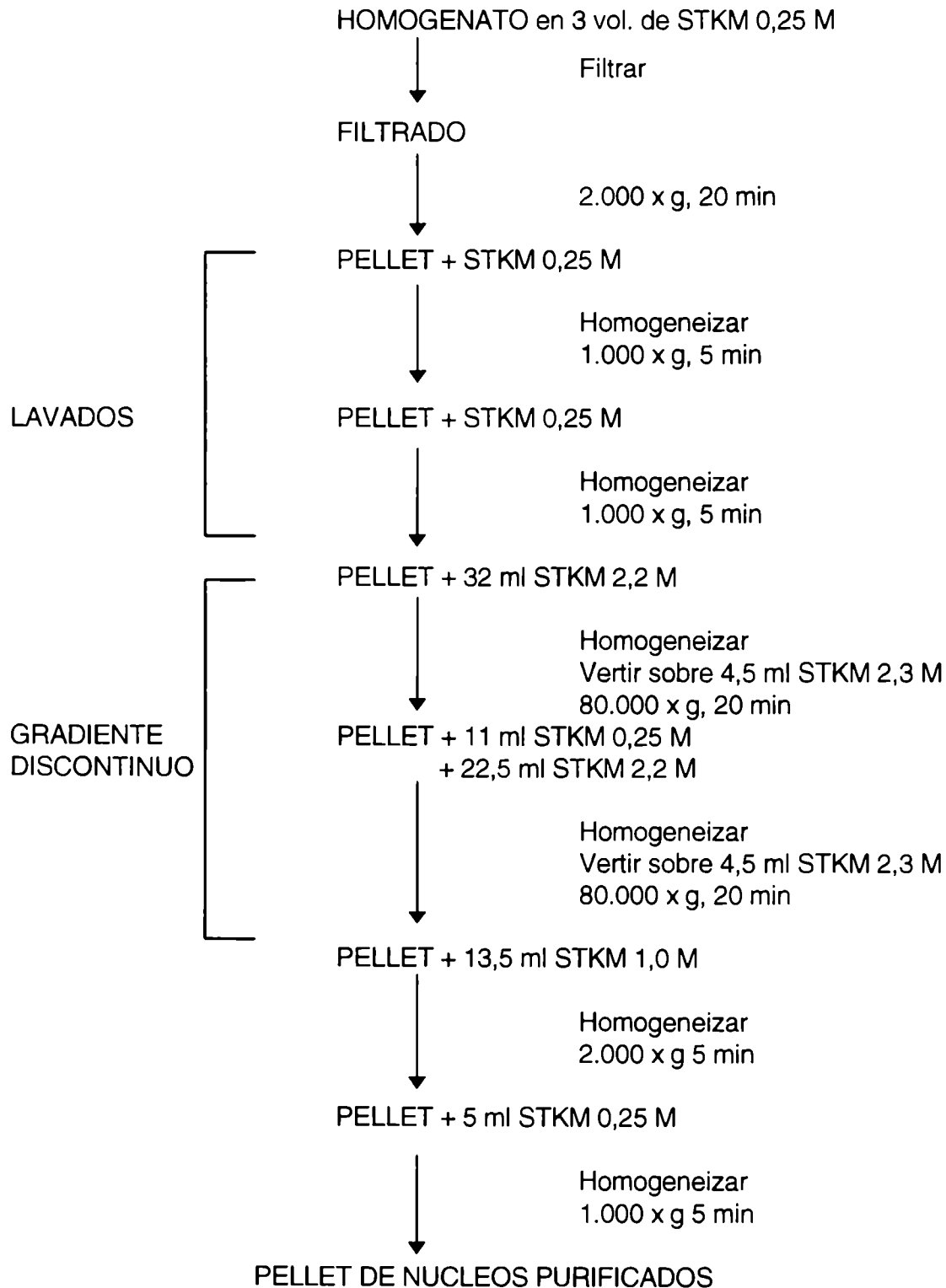
Se resuspendió el pellet con 13,5 ml de STKM 1,0 M, se homogeneizó y se centrifugó a 2000 x g, por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 ml de STKM 0,25 M, centrifugando a 1000 x g durante 5 minutos.

Todas las soluciones denominadas STKM sólo difieren en la concentración de sacarosa.

El pellet así lavado se suspendió en 2 ml del buffer sacarosa/ Tris/HCl pH 7,6 y se utilizaron 100 µl para determinar la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa.

La pureza del preparado nuclear se determinó por microscopía de contraste de fase, comprobando su integridad y mediante microscopía electrónica de transmisión, donde aparecieron sólo trazas de contaminación con retículo endoplásmico.

Figura III.4: Esquema de obtención de núcleos purificados del hígado de rata.



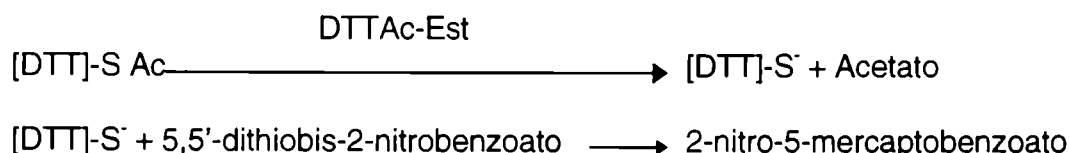
III.6.3 Determinación de proteínas

Las determinaciones de proteínas se hicieron según el procedimiento de Lowry y col., 1951. Se realizó una curva estandar con albúmina de suero bovino. Se midió frente a un blanco de 1 ml de agua y 4 ml de solución alcalina de cobre, que después de permanecer 10 min a temperatura ambiente se le agregó 0,4 ml del reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1+2 con agua destilada. Se leyó a los 30 minutos a 660 nm.

III.6.4 Determinación de la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa

Los grupos tioles liberados del DTTAc por la actividad tiolacetato esterasa se determinaron según el método espectrofotométrico de Ellman (Ellman, 1959) que emplea el ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB). La determinación se basa en la reacción indicada en la Figura III.5.

Figura III.5: Reacción para medir la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa.



Las mediciones se realizaron en un volumen total de 3 ml de buffer fosfato 100 mM, pH 7,7 (KH₂PO₄ 50 mM, Na₂HPO₄ 50 mM/NaOH) a 30°C. La concentración de DTNB en el medio de reacción fue de 0,25 mM. Para ello se preparó una solución de DTNB al 0,15% en el buffer fosfato 100 mM, que es estable durante 15 días. Se emplearon 50 µl de una solución metanólica de DTTAc 60 mM (preparada en el día) de manera de tener 1 mM en el medio de reacción. Las lecturas se realizaron espectrofotométricamente, en celdas de vidrio de 1 cm de camino óptico, a 412 nm. (Tabla III.1).

Las condiciones de pH y temperatura indicados son óptimas para que el DTNB reaccione con compuestos tiólicos alifáticos, produciendo un mol del anión 2-nitro-5-mercaptobenzoato por cada mol de tiol (Ellman, 1959).

MATERIALES Y METODOS

Tabla III.1: Determinación de la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa

	Blanco de reactivos	Muestra ^a	Muestra+ DTTAc
Buffer fosfato (ml)	0,95	0,90-0,95	0,85-0,90
DTNB ^b (ml)	2.00	2.00	2.00
DTTAc ^c (μl)	50	-	50
Muestra (μl)	-	5-100	5-100

^a La muestra es el homogenato de los diferentes tejidos o suspensiones de la fracciones subcelulares hepáticas. Con esta medición se contempla el aporte de los grupos SH de la muestra y la absorbancia propia de la misma.

^b Solución de DTNB 0,25 mM en buffer fosfato.

^c Solución de DTTAc 60 mM en CH₃OH.

La reacción se inició con el agregado de la enzima (las diferentes suspensiones) y se midió durante diferentes períodos, según la actividad enzimática.

Todas las lecturas se hicieron frente al blanco de reactivos y se les restaron las lecturas del tejido o fracciones subcelulares correspondientes. Es decir, para descontar otros tioles presentes en los preparados (como glutatión) se hicieron determinaciones que contienen la muestra y el DTNB pero no DTTAc.

III.6.5 Demostración de la hidrólisis enzimática del DTTAc

Se realizó un procedimiento similar al anterior, salvo que previamente, el volumen correspondiente de homogenato de tejido o fracciones celulares hepáticas se llevó a 0,95 ml con buffer fosfato y se calentó 5 min en un baño maría a 100 °C (Tabla III.2).

MATERIALES Y METODOS

Tabla III.2: Demostración de la hidrólisis enzimática del DTTAc

	Blanco de reactivos	Muestra ^a	Muestra+ DTTAc
Buffer fosfato (ml)	0,95		
DTNB ^b (ml)	2,00	2,00	2,00
Muestra calentada (ml)		1,00	0,95
DTTAc ^c (μl)	50		50

^a La muestra es el homogenato de los diferentes tejidos o suspensiones de la fracciones subcelulares hepáticas. Con esta medición se contempla el aporte de los grupos SH de la muestra y la absorbancia propia de la misma.

^b Solución de DTNB 0,25 mM en buffer fosfato.

^c Solución de DTTAc 60 mM en CH₃OH.

La reacción se inició con el agregado del sustrato, se leyó frente a blancos de reactivos y se restó la absorbancia de la muestra respectiva.

III.6.6 Curva de calibración

Se preparó una curva de calibración con clorhidrato de L-cisteína (Sedlak y Lindsay, 1968) para correlacionar la concentración de grupos sulfhidrilos con la absorbancia. La solución stock de cisteína 1,5 mM se preparó en EDTA 20 mM. La concentración de esta solución no varía en 10 días.

Alícuotas de la solución stock de cisteína se mezclaron con 1 ml de buffer fosfato y 2 ml de buffer fosfato con DTNB; se midió a 30 °C y 412 nm. La absorbancia fue lineal en el rango de concentraciones de 1,0 - 6,0 x 10⁻⁶ M.

El coeficiente de extinción molar obtenido en las condiciones empleadas fue 8.449 l/mol x cm.

III.6.7 Expresión de los resultados

La actividad enzimática se expresó en micromoles de grupos SH hidrolizados en un min. por g de proteína a 30 °C y pH 7,7.

$$\frac{\mu\text{moles SH}}{\text{min} \times \text{g prot}} = \frac{A \times V}{\text{min} \times c \times v \times \epsilon \times \text{cm}}$$

donde:

A	=	Absorbancia a 412 nm
V (l)	=	Volumen empleado en la celda
c (mg/ml)	=	Concentración de proteínas en la suspensión de lectura
v (ml)	=	Volumen de la suspensión de tejido o fracciones subcelulares que se colocó en la celda del espectrofotómetro
ϵ	=	Coeficiente de extinción molar = 8449 l/mol x cm obtenido de la curva de calibración

III.7 ESTUDIOS HISTOLOGICOS Y ENZIMATICOS PARA VERIFICAR SI EL DTTAc ES CAPAZ DE PREVENIR LA NECROSIS HEPATICA EN RATAS INTOXICADAS CON CCl₄

Se estudió si el DTTAc es capaz de prevenir significativamente la necrosis hepática en ratas intoxicadas con CCl₄, administrándole el DTTAc a varios tiempos después de la intoxicación. Se examinó el hígado histológicamente (Castro y col., 1972c) y se midieron los niveles plasmáticos de la actividad de isocítrico-deshidrogenasa (ICD), según Sterkel y col., 1958.

Se utilizaron animales intoxicados con CCl₄ y tratados con DTTAc a 0, 3, 6 y 10 h después del tóxico, como se detalló en Animales y Tratamientos. Después de 24 h se anestesiaron los animales para extraerle sangre (heparinizada) y el hígado. Cada grupo estuvo constituido por 10 ratas.

III.7.1 Estudios histológicos

Después de extraer el hígado se tomaron pequeñas porciones (2 cm x 0,5 cm) del lóbulo central izquierdo y se fijaron inmediatamente en solución de Bouin (70 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 25 ml de formaldehído 40% y 5 ml de ácido acético glacial) durante 24 horas. Luego se sometieron a un proceso de deshidratación utilizando alcoholes de graduación creciente (75%, 96% y 100%), efectuando tres lavados de 30 min con cada uno de ellos. Se los sometió luego a tres lavados, también de 30 min cada uno, con benceno como líquido intermediario, para luego embeberlos en parafina fundida a 60 °C durante 24 horas y por último se incluyeron en parafina.

Se realizaron cortes de 2-3 µm utilizando un micrótopo para cortes en parafina Reichert que fueron luego coloreados con hematoxilina-eosina de Mayer (Di Fiori, 1974).

Los tiempos utilizados para la desparafinación, hidratación, coloración y posterior deshidratación fueron los siguientes:

xilol	20 min
alcohol 100%	7 min

MATERIALES Y METODOS

alcohol 96%	7 min
agua corriente	10 min
hematoxilina-eosina de Mayer	10 min
agua corriente	20 min
eosina	5 min
alcohol 96%	1 min
alcohol 100%	1 min
xilol	30 min

Los preparados se observaron con un microscopio óptico.

Las muestras se codificaron para asegurar la imparcialidad en la observación y se evaluaron por 2 observadores independientes. Para cuantificar los cambios morfológicos, la secciones de hígado se clasificaron según su grado de necrosis y empleando una escala arbitraria:

- + = suave, aproximadamente 20-30% de necrosis
- ++ = moderado, aproximadamente 50% de necrosis
- +++ = marcado, aproximadamente 75% de necrosis
- ++++ = muy intenso, aproximadamente 90-100% de necrosis.

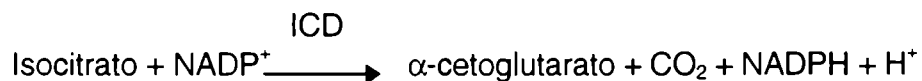
Los resultados representan la media de las observaciones realizadas por los dos observadores para una dada condición experimental.

III.7.2 Determinación de la actividad de isocítrico-deshidrogenasa plasmática.

La velocidad de la reacción de descarboxilación oxidativa del isocitrato para dar α -cetoglutarato (Fig. III.6) es proporcional a la actividad de la isocítrico-deshidrogenasa (ICD) (Sterkel y col., 1958).

Esta velocidad puede ser medida siguiendo el incremento de la absorbancia a 340 nm que resulta cuando el NADP^+ es transformado en NADPH. Ambos absorben a 340 nm pero el NADPH presenta una absorbancia mayor a esa longitud de onda.

Fig. III.6: Reacción catalizada por la enzima ICD



Técnica

Se mezclaron en un tubo de ensayo 1 ml de buffer tris 0,1 M (pH 7,5); 0,4 ml de NADP (9×10^{-4} M); 0,6 ml cloruro de manganeso (MnCl_2) 20 mM y 0,1 ml de solución de isocitrato de sodio 0,1 M. Se colocó en un baño de agua a 25°C durante 3 minutos. A continuación se añadió 0,02 ml de plasma, se mezcló y se leyó el incremento de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro termostatzado a 25°C, durante 5 min en intervalos de 15 seg, usando la mezcla de incubación como referencia.

Los resultados se expresan en unidades. Una unidad de ICD plasmática es la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nanomol de NADPH por ml de plasma por hora a 25°C bajo las condiciones especificadas en la técnica (Sterkel y col., 1958).

III.8 EFECTOS DEL PRETRATAMIENTO CON DTTAc EN:

- LA CONCENTRACION DEL $^{14}\text{CCl}_4$ EN HIGADO DE RATAS.
- LA UNION COVALENTE DEL $^{14}\text{CCl}_4$ A LIPIDOS MICROSOMALES HEPATICOS.
- LA PEROXIDACION DE LIPIDOS MICROSOMALES INDUCIDA POR CCl_4 .

Con el motivo de intentar explicar el efecto protector del DTTAc en la intoxicación por CCl_4 , se determinó la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado de ratas para ver si el DTTAc la modifica. La determinación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Recknagel y Litteria (1960) hasta la etapa de microdifusión.

Se midió también la unión covalente de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomaes hepáticos, es decir, la incorporación in vivo del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomaes (Castro y col., 1972c).

Además, se cuantificó la peroxidación de lípidos microsomaes para investigar si era modificada por el DTTAc (Klaasen y Plaa, 1969). La determinación se basa en la absorción ultravioleta de los dienos conjugados presentes en extractos lipídicos de las fracciones microsomaes, según la técnica descrita por Klaasen y Plaa (1969).

III.8.1 Determinación de la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado

Para las dos primeras determinaciones los animales se trataron según se especifica en Animales y Tratamientos, con una solución de CCl_4 al 5% (v/v) en aceite de oliva (14×10^6 dpm/ml), con una dosis de 5 ml/kg, 30 min después del DTTAc. Las ratas se sacrificaron 1 y 3 horas después de la administración del tóxico.

Una vez extraído y pesado el hígado se procedió a su homogeneización en un volumen igual a dos veces su peso en una solución de sacarosa 0,3 M/EDTA 3mM con un homogeneizador de teflón-vidrio Potter-Elvehjem.

Para medir la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado se utilizó una celda de microdifusión de Conway de 12 cm de diámetro externo y 2 cm de diámetro interno. En el compartimento central se colocó 0,5 ml de tolueno y en el exterior 1 ml del homogenato de hígado y se dejó difundir durante 24 horas a temperatura ambiente.

MATERIALES Y METODOS

Luego todo el contenido del compartimento central de la celda de microdifusión fue transferido a un vial de centelleo que contenía 10 ml de una solución al 0,5% de 2,5-difeniloxazol (PPO) en tolueno. Finalmente se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Los resultados obtenidos fueron corregidos por la atenuación (quenching en la terminología anglosajona) mediante el método que usa la relación de canales, y se les descontó el valor del blanco (se tomó como blanco una solución de PPO sin muestra). Los resultados se expresaron en desintegraciones por minuto por gramo de hígado (DPM/g híg) considerando que toda la radioactividad se encontraba en forma de $^{14}\text{CCl}_4$.

Cálculos:

a= DPM muestra - DPM blanco

b= $\frac{\text{Peso del hígado (g) x vol utilizado en la celda (ml)}}{\text{vol final del homogenato (ml)}}$

0,52= factor de recuperación por pérdidas en la celda de microdifusión

DPM/g de hígado = $\frac{a}{b \times 0,52}$

III.8.2 Determinación de la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales

Para determinar la unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales el homogenato anterior se centrifugó a 9000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante luego se centrifugó 1 h a 105.000 x g en una ultracentrífuga. El pellet microsomal se resuspendió en 2 ml de la solución de sacarosa 0.3 M/EDTA 3 mM. Se tomó una alícuota de 1 ml de esta suspensión microsomal y se le agregaron 19 ml de cloroformo-metanol (2:1). La mezcla se agitó en el vortex durante 1 minuto y luego se centrifugó a 3.000 x g durante 15 minutos y se decantó a otro tubo de centrifuga. Se añadieron 4 ml de agua destilada, se mezclaron las dos fases por agitación en el vortex durante 1 minuto y luego se centrifugó a 3.000 x g durante 5 minutos. La fase acuosa superior fue aspirada con trompa de vacío y desechada; la fase clorofórmica (fase inferior

MATERIALES Y METODOS

remanente) fue lavada 2 veces con 1 ml de solución de lavado preparada en el día. La misma es la fase superior de una mezcla de 25 ml de agua destilada y 95 ml de cloroformo-metanol (2:1), que se mezcló por agitación y se dejó en reposo. La base clorofórmica lavada se evaporó en frasco de centelleo previamente tarado en atmósfera de nitrógeno a 40°C. Después de agregar al residuo 0,5 ml de CCl₄ no marcado para favorecer la eliminación del CCl₄ remanente no irreversiblemente unido a los lípidos microsomales, la muestra fue secada nuevamente a 40°C hasta constancia de peso. Luego el residuo se disolvió en 10 ml de una solución al 0,5% de 2,5-difeniloxazol (PPO) en tolueno y se midió su radioactividad en un contador de centelleo líquido. Los resultados fueron corregidos por la atenuación y se les descontó el valor del blanco. Los resultados se expresaron en desintegraciones por minuto por mg de lípidos microsomales.

Cálculos:

$$\text{DPM/mg lípido} = \frac{\text{DPM muestra} - \text{DPM blanco}}{\text{peso de lípidos (mg)}}$$

III.8.3 Peroxidación de lípidos microsomales inducida por CCl₄

Las ratas machos se intoxicaron con una dosis de 1 ml/kg del CCl₄ 30 min después del DTTAc y se sacrificaron 1 y 3 horas después de la administración del tóxico.

Una vez extraído el hígado se procedió a su homogeneización en un volumen igual a dos veces su peso en una solución de sacarosa 0,3 M/EDTA 3 mM con un homogeneizador. El homogenato se centrifugó a 9.000 x g durante 20 minutos. La fracción sobrenadante fue luego centrifugada 1 hora a 105.000 x g en una ultracentrífuga. El pellet microsomal se homogeneizó en 2 ml de la solución anterior de sacarosa/EDTA. Se tomó 1 ml de esta suspensión microsomal y se le agregaron 19 ml de cloroformo-metanol (2:1). La mezcla se agitó durante 1 minuto en vortex y luego se centrifugó a 3.000 x g durante 15 minutos y se decantó a otro tubo. Se añadieron 4 ml

MATERIALES Y METODOS

de agua destilada, se mezclaron las dos fases por agitación durante 1 minuto en vortex y luego se centrifugó a 3.000 x g durante 5 minutos. La fase acuosa superior fue aspirada con trompa de vacío y desechada; la fase clorofórmica (fase inferior remanente) fue lavada 2 veces con 1 ml de solución de lavado. La misma es la fase superior de una mezcla de 25 ml de agua destilada y 95 ml de cloroformo-metanol (2:1), que se mezcló por agitación y se dejó en reposo. A la fase clorofórmica lavada se le agregaron 0.4 ml de metanol para eliminar la turbidez y se midió la absorbancia a 243 nm en un espectrofotómetro. Se evaporaron 10 ml exactamente medidos de la solución en viales tarados a 40°C en atmósfera de nitrógeno para determinar el peso del residuo lipídico. Los resultados están expresados como la absorbancia a 243 nanometros x 1.000 de una solución que contiene 1 mg de lípidos microsomales por ml.

III.9 DETERMINACION DEL EFECTO DEL DTT EN LA FORMACION DE MALONDIALDEHIDO PRODUCIDO DURANTE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS MICROSOMALES PROVOCADA POR EL CCl₄ IN VITRO

Para estudiar si el DTT interfiere en la etapa de propagación de la peroxidación de lípidos microsomales, provocada por el CCl₄ "in vitro" se empleó el método espectrofotométrico del ácido tiobarbitúrico (Willis, 1987). Esta técnica determina los aldehídos formados por degradación de los hidroperóxidos y endoperóxidos, incluyendo el malondialdehído, que se emplea como estándar. En general se llaman sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

La incubación de la suspensión microsomal (0.5 ± 0.1 mg de prot/ml) se llevó a cabo en presencia del CCl₄ 2 mM en etanol, sistema generador de NADPH 0.45 mM, MgCl₂ 5 mM y 0.02 U de isocítrico-deshidrogenasa (ICD/NADP) en un volumen final de 3 ml de buffer KH₂PO₄ 100 mM pH 7.4.

El sistema generador de NADPH está formado por la sal trisódica del d,l-ácido isocítrico (36 mM) y β -NADP (4.5 mM) en buffer KH₂PO₄ 100 mM pH 7.4.

Las mezclas de incubación contenían DTT en concentraciones de 1 y 3 mM en buffer fosfato. Se comparó con los resultados obtenidos sin DTT, también se realizaron los blancos correspondientes sin NADPH o sin CCl₄.

La reacción se desarrolló durante 30 minutos a 37°C en viales de vidrio tapados (Tabla III.3) y se detuvo enfriando (0-4°C) los frascos de incubación.

Tabla III.3: Efectos del DTT sobre la formación de TBARS

	Control ^a	NADPH	DTT	DTT NADPH	CCl ₄	CCl ₄ NADPH	CCl ₄ DTT	CCl ₄ DTT NADPH
Suspensión de microsomas (ml)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Buffer fosfato (ml)	2.00	1.40	2.00	1.40	2.00	1.40	2.00	1.40
MgCl ₂ (ml)	--	0.30	--	0.30	--	0.30	--	0.30
Sistema generador de NADPH (ml)	--	0.30	--	0.30	--	0.30	--	0.30
DTT 1 ó 3 mM (μl)	--	--	100	100	--	--	100	100
CCl ₄ (μl)	--	--	--	--	5	5	5	5
Isocítrico deshidrogenasa (ICD) (μl)	--	6	--	6	--	6	--	6

^a El control es la incubación de la suspensión de microsomas solamente. En las otras muestras se agregó sistema generador de NADPH, DTT o CCl₄ o combinaciones de los mismos.

En alícuotas (2 ml) de las mezclas de reacción se determinó la formación de TBARS. El ensayo consiste en calentar en baño maría durante 10 minutos las alícuotas del incubado con ácido tricloroacético 20% p/v conteniendo FeSO₄ 1 mM (1 ml) y ácido tiobarbitúrico 0.67% p/v (2 ml). Finalmente se centrifugó para separar el precipitado de proteínas y se leyó la absorbancia del color rosa formado a 530 nm.

Los valores de TBARS se expresaron como μmoles de malondialdehído formado por g de proteína, usando un coeficiente de extinción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^2$ por mmol.

III.10 REACCION DEL DTT CON PEROXIDOS ORGANICOS

Se estudió la posible reacción del DTT con un peróxido orgánico representativo, el peróxido de benzoílo. La mezcla de reacción contenía buffer fosfato 100 mM, pH 7 (KH_2PO_4 50 mM, Na_2HPO_4 50 mM/ NaOH); DTT 0.10 mM y peróxido de benzoílo 0.05 mM en un volumen final de 3 ml. Las soluciones stock de DTT y peróxido de benzoílo se realizaron en etilenglicol-dimetiléter (glyme) para aumentar la estabilidad de ambos y asegurar la solubilidad del peróxido en el medio acuoso de la mezcla de reacción. La misma se desarrolló a 25°C durante 1 h (Tabla III.4)

Tabla III.4: Reacción del DTT con peróxidos orgánicos

	Blanco de reactivos	Control DTT	Control Peróxido	Mezcla de Reacción
Buffer pH 7 (ml)	3	3	3	3
Glyme (μl)	100	50	50	--
Solución de DTT ^a (μl)	--	50	--	50
Solución de Peróxido ^b (μl)	--	--	50	50

^a Solución de DTT 6 mM en glyme para disminuir la oxidación espontánea.

^b Solución de peróxido de benzoílo 3 mM en glyme para disminuir la descomposición espontánea.

Las variaciones en la concentración de DTT se determinaron por el método de Ellman (1959) en una alícuota de 1 ml de la mezcla de reacción (Sección III.6.4). Dicha alícuota se extrajo previamente 3 veces con igual volumen de tolueno para evitar un exceso de peróxido de benzoílo e impedir que interfiera con el producto coloreado de la reacción de Ellman (2-nitro-5-mercapto benzoato).

III.11 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa "Instant Biostatistics", 1990-1993.

Las medias de dos columnas se compararon empleando el test de t Student desapareado (los valores de la misma línea no están relacionados). Este test considera que la población se distribuye normalmente y que las DE son iguales. Cuando la distribución F sugirió que la diferencia entre las dos DE era significativa se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores de P son a dos colas.

El análisis de los datos de 4 columnas se realizó usando el análisis de varianza ordinario (los valores de la misma línea no están relacionados). Cuando $P < 0.05$ se empleó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni, que compara todos los pares de columna para indicar los grupos que son significativamente diferentes. Los 4 grupos se refieren a los animales control, intoxicados con CCl_4 y los que sólo recibieron DTTAc y los que fueron intoxicados y tratados con DTTAc.

IV. RESULTADOS

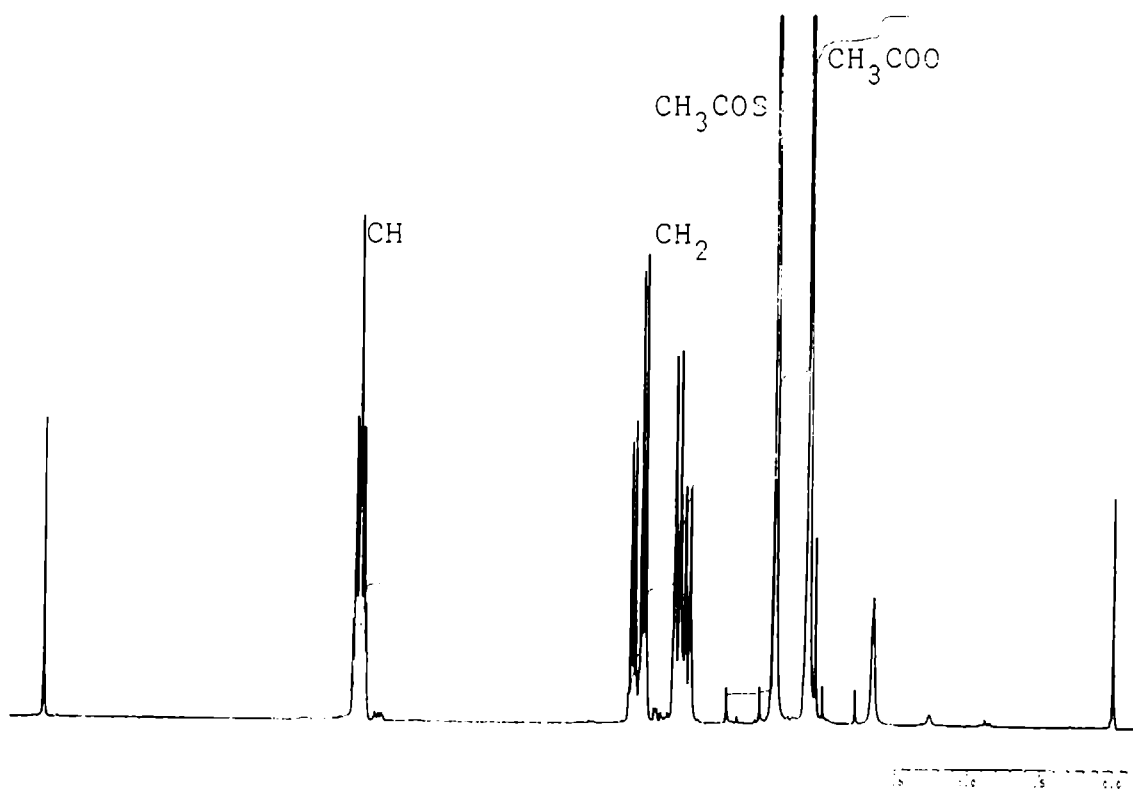
IV.1 SINTESIS Y CARACTERIZACION DEL TETRAACETATO DE DITIOTREITOL

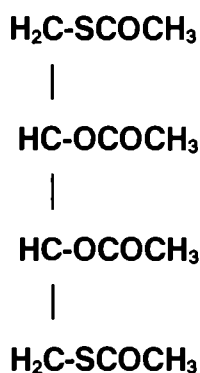
La síntesis del tetraacetato de ditiotreitól (DTTAc) se realizó según se detalló en "Materiales y Métodos" (III.3.1) obteniéndose un rendimiento de $85 \pm 5\%$.

La caracterización del producto obtenido de la síntesis se realizó por resonancia magnética nuclear (^1H -RMN) y por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (CGL/EM).

El espectro de ^1H -RMN se observa en la Figura IV.1 y el de masas en la Figura IV.2

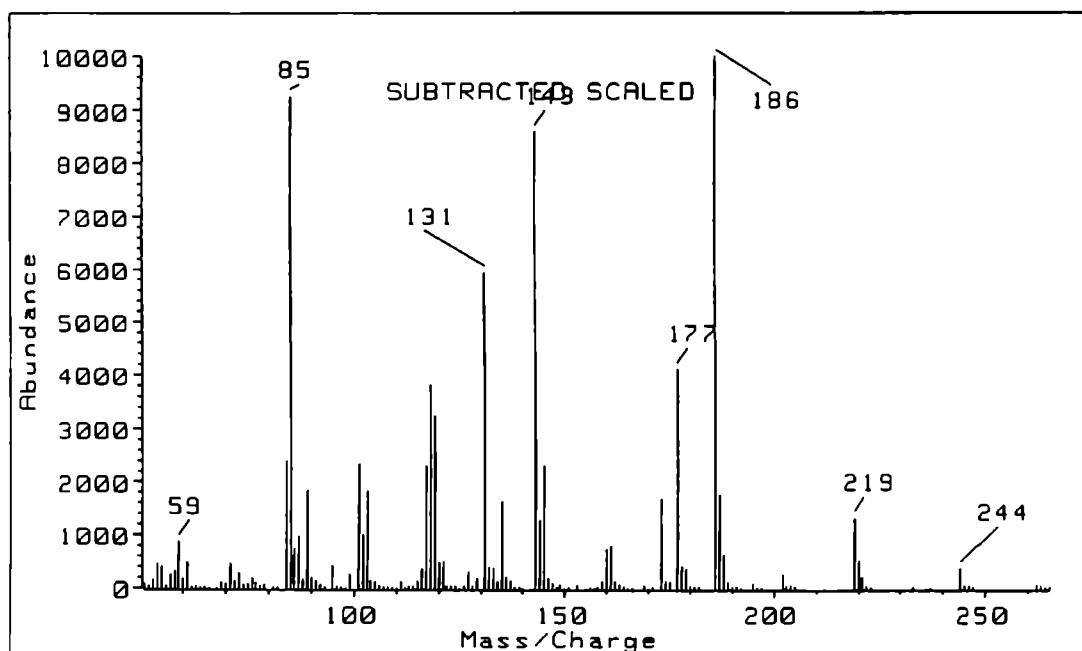
Fig. IV.1: Espectro de ^1H -RMN (100 MHz) del DTTAc con TMS como estándar





Las señales se asignaron según : $\delta=2.1$ (singulete, 6H, metilo de acetato), $\delta=2.3$ (singulete, 6H, metilo de tiolacetato), $\delta=3.0$ (multiplete, 4H, metilenos) y $\delta=5.0$ (multiplete, 2H, metinos).

Figura IV.2: Espectro de masas del DTTAc (70 eV).



$M^+ = m/z$ 322 (no se observa); el pico base aparece a m/z 186 que corresponde a las pérdidas de ácido acético y tiolacético desde M^+ . Otros fragmentos son: m/z 85 ($\text{C}_4\text{H}_5\text{S}^+$); m/z 177 ($\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_2\text{S}_2^+$); m/z 143 ($\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2\text{S}^+$); m/z 131 corresponde a la pérdida de CH_2S desde m/z 177.

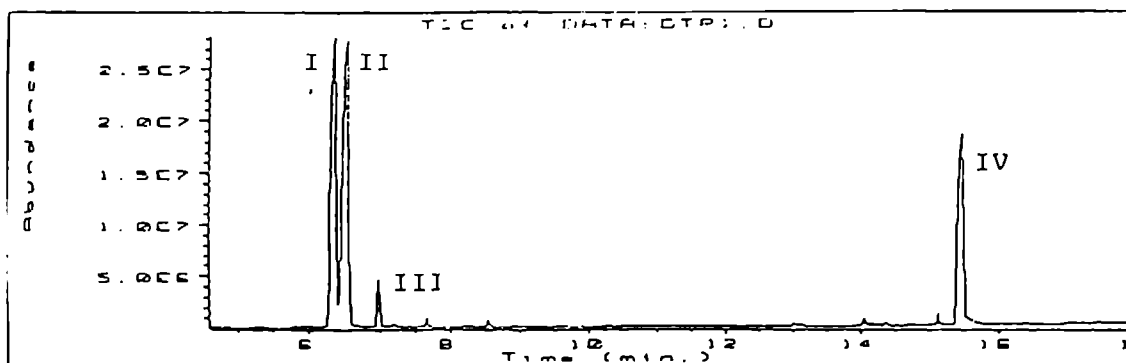
El espectro de ^1H -RMN y el de masas coinciden con la composición química del tetraacetato de ditiotreitól (DTTAc).

RESULTADOS

Se utilizaron las condiciones cromatográficas señaladas en Materiales y Métodos para resolver la mezcla de DTTAc y los derivados trifluoroacetilados de DTT y DTTox.

La Figura IV.3 muestra el cromatograma correspondiente.

Figura IV.3: Cromatograma de corriente iónica total del DTT y DTTox trifluoroacetilados y DTTAc.



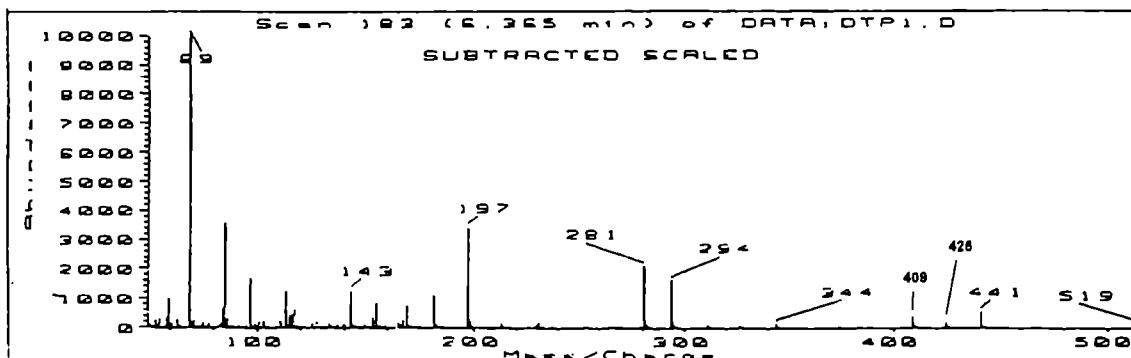
Columna: 5% fenilmetilsilicona, 90°C a 280°C a 10°C/min. Pico I: DTT, II: DTTox (isómero trans), III: DTTox (isómero cis), IV: DTTAc.

Con el objeto de detectar DTT y DTTox como impurezas en el producto de síntesis y de realizar las mediciones de los mismos en medios biológicos con suficiente sensibilidad, se hicieron también los espectros de masas de DTT y DTTox trifluoroacetilados y se seleccionaron de los mismos los iones característicos de cada compuesto.

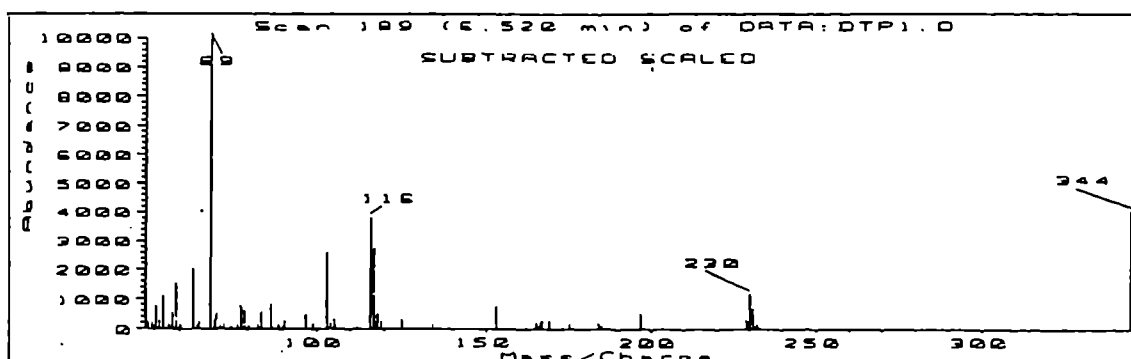
Las figuras IV.2 y IV.4 representan los espectros de masas del DTTAc y del DTT y DTTox trifluoroacetilados respectivamente.

Figura IV.4: Espectros de masas del a) DTT y del b) trans-DTTTox trifluoroacetilados.

a)



b)



a) $M^+ = m/z$ 538, el pico base corresponde a m/z 69 ($^+CF_3$). Otros fragmentos son: m/z 519 ($M - F$), m/z 441 ($M - CF_3CO^+$), m/z 425 ($M - CF_3COO^+$), m/z 409 ($M - CF_3COS^+$) y m/z 344 ($M - 2 \times CF_3CO^+$).

b) $M^+ = m/z$ 344, pico base a m/z 69. Otros fragmentos: m/z 230 ($M - CF_3COOH$) y m/z 116 ($M - 2 \times CF_3COOH$).

Las masas seleccionadas fueron para el DTTAc m/z 186 y 143, para el DTT m/z 197 y 441 y para el DTTTox m/z 344 y 116. Estas se utilizaron para determinar dichos compuestos en el modo de detección por monitoreo selectivo de iones (SIM) por CGL/EM.

En las muestras de DTTAc recristalizado no se detectaron impurezas de DTT ni DTTTox empleando el modo de detección citado por CGL/EM.

RESULTADOS

En la mezcla HCCl_3 : buffer Tris/HCl 0,15 (pH 7.4) el compuesto se disolvió solamente en la fase orgánica.

El DTTAc es muy soluble también en tetracloruro de carbono (CCl_4), diclorometano (CH_2Cl_2), benceno (C_6H_6) y prácticamente insoluble en agua.

RESULTADOS

IV.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION SANGUINEA Y HEPATICA DE DTT EN RATAS TRATADAS CON DTTAc

La detección y cuantificación del DTTAc y sus metabolitos se realizó en el modo SIM por CGL/EM. Los niveles en sangre de ditiotreitol se observan en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1: Niveles en sangre de ditiotreitol (DTT)

Tiempo después de la administración ^a	µg DTT/ml ± DE ^b
1 h	16.90 ± 3.43
2 h	9.92 ± 1.33

^a Los animales recibieron una única dosis i.p. de 200 mg/kg de DTTAc, suspendido en solución salina de carboximetilcelulosa al 1% (1 ml/200 g de peso). Se obtuvieron las muestras de sangre y se determinó el DTT por CGL/EM-SIM.

^b Cada valor representa la media ± DE de 3 valores independientes.

Los resultados de los niveles de DTT en sangre demuestran que el DTTAc administrado ip se hidroliza rápida y completamente, ya que no se detectó el tetraacetilado aún una hora después administrado a ratas.

Los niveles en hígado de ditiotreitol se observan en la Tabla IV.2.

RESULTADOS

Tabla IV.2: Niveles en hígado de ditiotreitól (DTT)

Tiempo después de la administración ^a	µg DTT/g hígado ± DE ^b
30 min	31,40 ± 0,93
1 h	21,23 ± 1,72

^a Los animales recibieron una única dosis ip de 200 mg/kg de DTTAc, suspendido en solución salina de carboximetilcelulosa al 1% (1 ml/200 g de peso). Se obtuvieron las muestras de hígado y después de procesarlas se determinó el DTT por CGL/EM-SIM.

^b Cada valor representa la media ± DE de 3 valores independientes.

Estos resultados demuestran que el DTT llega al hígado de ratas tratadas con el mismo y la concentración del DTT es mayor al tiempo más corto de tratamiento.

RESULTADOS

IV.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DTTAc-TIOLACETATO ESTERASA

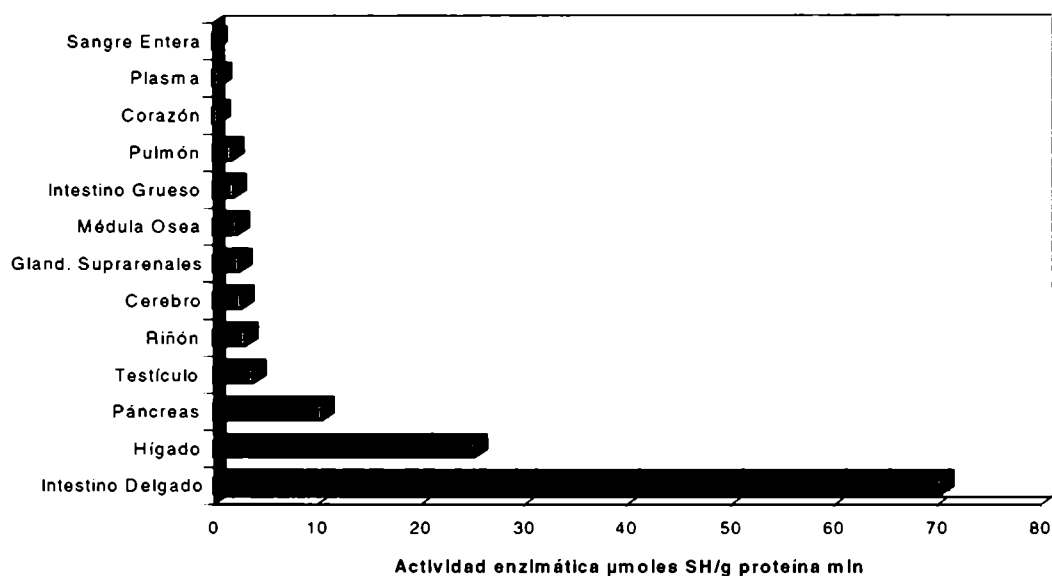
Se midió la actividad DTTAc tiolacetato esterasa en diferentes órganos, sangre total, plasma (Tabla IV.3 y Figura IV.5) y en distintas fracciones subcelulares hepáticas (Tabla IV.4 y Figura IV.6) para estudiar la incidencia de los mismos en la hidrólisis del DTTAc.

Tabla IV.3: Actividad DTTAc tiolacetato esterasa en distintos órganos, sangre entera y plasma.

Organo	Actividad enzimática \pm DE ^a (μ moles SH/g proteína min.)
intestino delgado	70.4 \pm 22.3
hígado	25.2 \pm 3.0
páncreas	10.4 \pm 3.4
testículo	3.8 \pm 0.1
riñón	3.1 \pm 0.8
cerebro	2.7 \pm 0.2
adrenales	2.5 \pm 0.7
médula ósea	2.3 \pm 0.1
colon	2.0 \pm 0.5
pulmón	1.8 \pm 0.2
corazón	0.5 \pm 0.2
plasma	0.6 \pm 0.1
sangre entera	0.2 \pm 0.1

^a Las determinaciones fueron realizadas según el método de Ellman empleando como sustrato DTTAc. Cada resultado es el promedio de tres medidas independientes.

Figura IV.5: Representación gráfica de la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa en distintos órganos, sangre entera y plasma



Los resultados demuestran que la enzima DTTAc-tiolacetato esterasa está ampliamente distribuida en el organismo. En efecto, se halló una actividad enzimática significativa en varios órganos, sangre entera y en plasma. La actividad relativa resultó: intestino delgado >> hígado > páncreas >> testículos ~ riñón ~ cerebro ~ adrenales ~ médula ósea ~ colon ~ pulmones >> corazón. Comparando plasma y sangre entera la actividad DTTAc-Est plasmática es mayor.

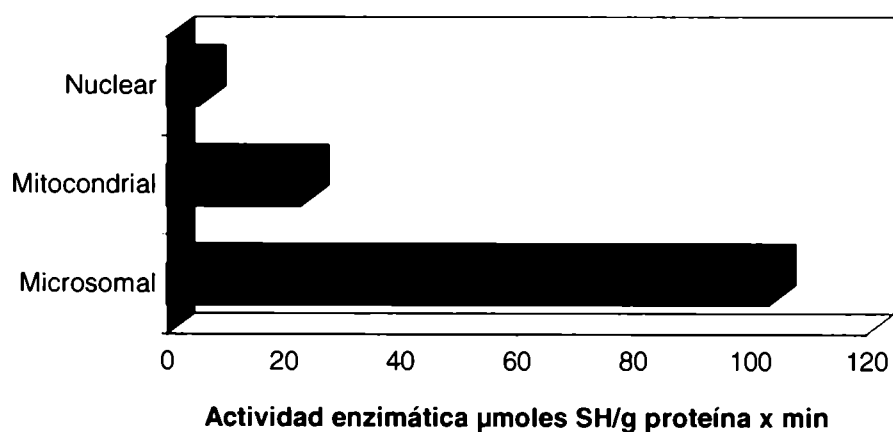
RESULTADOS

Tabla IV.4: Actividad DTTAc-tiolacetato esterasa en distintas fracciones subcelulares hepáticas

Fracciones subcelulares hepáticas	Actividad enzimática \pm DE^a (μmoles SH/g proteína min)
microsomas	103.2 \pm 11.9
mitocondrias	22.9 \pm 1.6
núcleos	5.3 \pm 0.5
citosol	No detectable

^a Las determinaciones fueron realizadas según el método de Ellman empleando como sustrato DTTAc. Cada resultado es el promedio de tres medidas independientes.

Figura IV.6: Representación gráfica de la actividad DTTAc-tiolacetato esterasa en distintas fracciones subcelulares hepáticas



Las fracciones subcelulares hepáticas también difieren en su capacidad de desacetilar el DTTAc y esta actividad se concentra especialmente en la fracción microsomal. No presentó actividad DTTAc-tiolesterasa la fracción citosólica.

RESULTADOS

La hidrólisis del DTTAc no ocurrió cuando los homogenatos de los diferentes tejidos o suspensiones de las fracciones subcelulares hepáticas se calentaron 5 min. en un baño maría a 100 °C. Estos resultados demuestran que la hidrólisis del DTTAc es de carácter enzimático en todas las muestras biológicas ensayadas.

RESULTADOS

IV.4 PREVENCIÓN DE LA NECROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCl₄ CON DTTAc. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS Y MEDIDAS DE ENZIMAS EN PLASMA

Los resultados de los estudios histológicos y de ICD en plasma se observan en la Tabla IV.5 y en las Figuras IV.7 a IV.11.

Tabla IV.5: Efecto de la administración de DTTAc sobre la necrosis hepática inducida por CCl₄ y la actividad de ICD plasmática a 24 horas de la intoxicación

Tratamiento ^a	Grado de Necrosis	ICD (unidades±DE) ^b
SIMULTANEO		
Control		150 ± 50
DTTAc		140 ± 45
CCl ₄	++++	52500 ± 11700
CCl ₄ + DTTAc	+	6600 ± 3000 ^c
3 HORAS		
Control		130 ± 40
DTTAc		115 ± 65
CCl ₄	++++	71550 ± 26700
CCl ₄ + DTTAc	++ a +++	6300 ± 3800 ^c
6 HORAS		
Control		120 ± 45
DTTAc		160 ± 50
CCl ₄	++++	74870 ± 23500
CCl ₄ + DTTAc	++++	58250 ± 32200 ^d
10 HORAS		
Control		125 ± 35
DTTAc		155 ± 40
CCl ₄	++++	66150 ± 17700
CCl ₄ + DTTAc	++++	57000 ± 32160 ^d

RESULTADOS

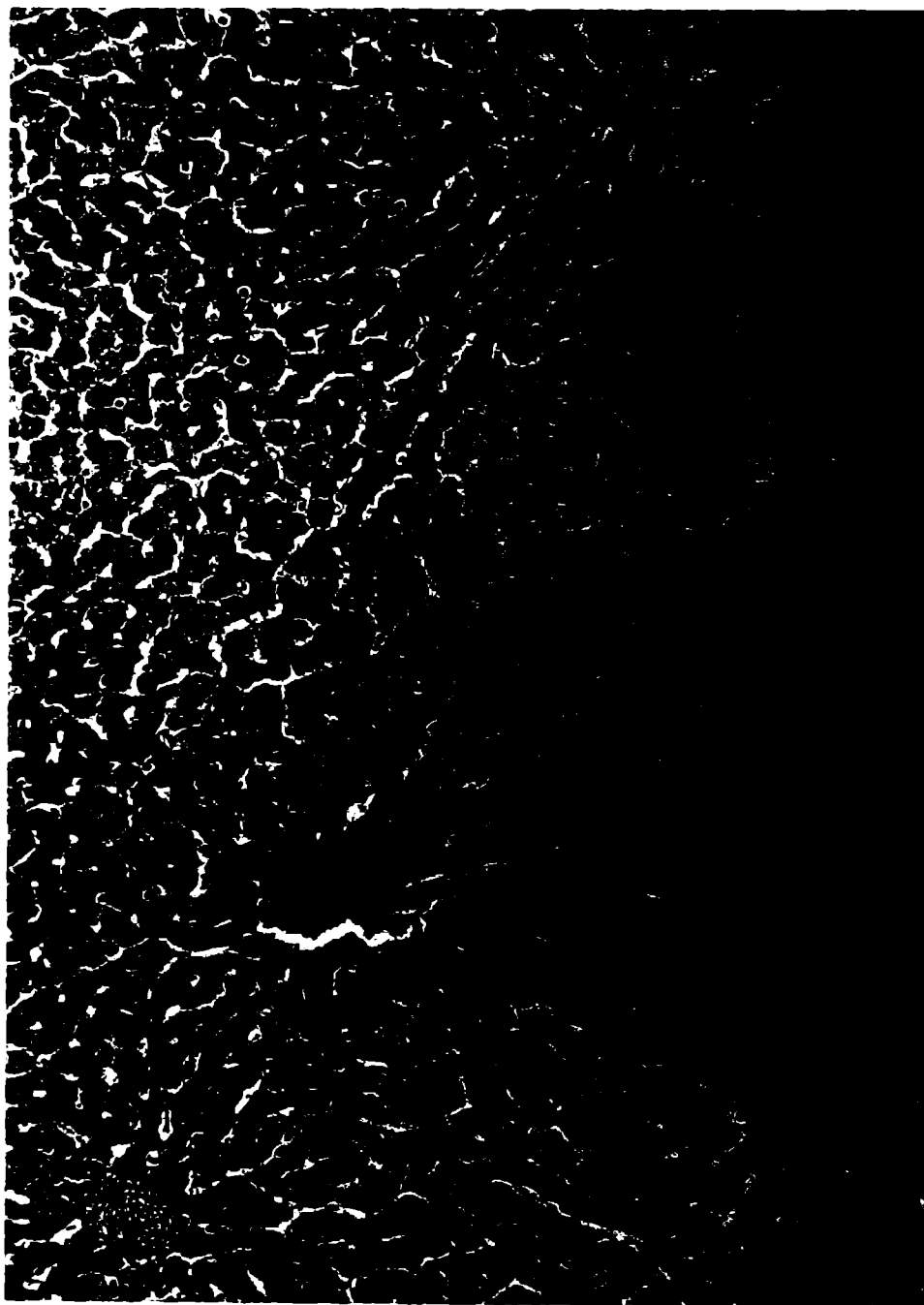
^a Las ratas se trataron ip con 1 ml de CCl₄/kg. El DTTAc se administró ip 200 mg/kg suspendido en solución salina de carboximetilcelulosa al 1%, salvo en el experimento con administración simultánea, donde se disolvió en la solución de CCl₄. El DTTAc se administró a 0, 3, 6 y 10 h después del tóxico. Cada grupo estuvo constituido por 10 animales.

^b Actividad isocítrico deshidrogenasa: una unidad de enzima es la cantidad necesaria para formar un nanomol de NADPH por ml por hora a 25°C.

^c $p < 0.001$ cuando se compara con el correspondiente grupo CCl₄.

^d $p > 0.05$ cuando se compara con el correspondiente grupo CCl₄.

Figura IV.7: Observación histológica de un corte de hígado de rata control



Corte de hígado de rata 24 h después de la administración ip de solución salina de carboximetilcelulosa al 1%. Hematoxilina y eosina x 200.

Figura IV.8: Observación histológica de un corte de hígado de rata tratada con DTTAc



Corte de hígado de rata 24 h después de la administración de DTTAc. Su apariencia es similar a la del control. Hematoxilina y eosina x 200.

Figura IV.9: Observación histológica de un corte de hígado de rata tratada con CCl_4



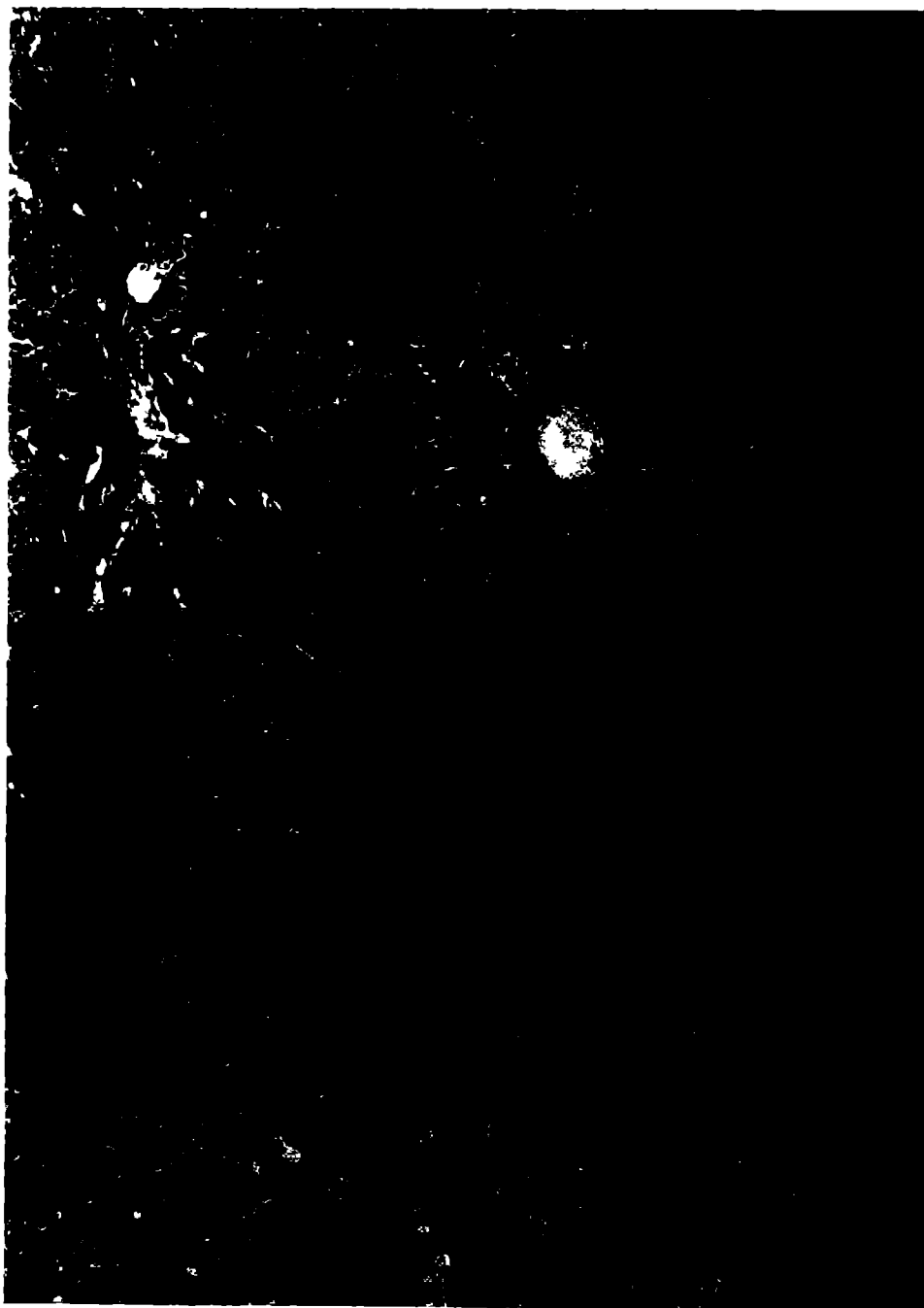
Corte de hígado de rata 24 h después de la administración de CCl_4 . Se observa necrosis centrolobulillar intensa. Hematoxilina y eosina x 200.

Figura IV.10: Observación histológica de un corte de hígado de rata tratada con CCl_4 y DTTAc simultáneamente.



Corte de hígado de rata 24 h después de la administración de CCl_4 . Esta rata fue tratada con DTTAc simultáneamente con el CCl_4 . Hay pequeñas áreas de necrosis. Las zonas periportales están bien preservadas. Hematoxilina y eosina x 200.

Figura IV.11: Observación histológica de un corte de hígado de rata tratada con CCl_4 y DTTAc 3 horas después de la toxina.



Corte de hígado de rata 24 h después de la administración de CCl_4 . Esta rata fue tratada con DTTAc 3 h después de la toxina. Hay pequeñas áreas de necrosis. Las zonas periportales están bien preservadas. Hematoxilina y eosina x 200.

RESULTADOS

La histología revela que el DTTAc administrado solo no alteró significativamente la estructura del hepatocito a las 24 h, cuando se lo compara con su respectivo control (Figuras IV.7 y IV.8). La administración del CCl₄ produjo a las 24 h una intensa necrosis centrolobulillar (+++++) (Figura IV.9). El tratamiento con DTTAc, dado simultáneo con el tóxico ó 3 h después, disminuyó significativamente la extensión de la necrosis producida por la hepatotoxina 24 h después de administrada (Figuras IV.10 y IV.11).

Además, el tratamiento con DTTAc simultáneamente o 3 h después del CCl₄ disminuyó significativamente los niveles de ICD plasmática 24 h después de la administración de la hepatotoxina.

No se observaron efectos preventivos cuando se dio DTTAc 6 y 10 h después del CCl₄ según demuestran la histología y la determinación de ICD.

RESULTADOS

IV.5 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON DTTAc EN LA CONCENTRACION DE $^{14}\text{CCl}_4$ EN HIGADO Y EN LA UNION COVALENTE DEL $^{14}\text{CCl}_4$ A LIPIDOS MICROSOMALES HEPATICOS

Los resultados se observan en la Tabla IV.6 y están representados en la Figuras IV.12, IV.13 y IV.14.

Tabla IV.6: Efecto del pretratamiento con DTTAc en la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado de ratas y en la unión covalente de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales hepáticos.

Tratamiento ^a	Concentración ± DE (dpm/g hígado)	UC ± DE (dpm/mg líp.)	R x 10 ⁻³ ± DE ^b
1 hora			
$^{14}\text{CCl}_4$	20540 ± 2230	105 ± 7	5,20 ± 0.69
$^{14}\text{CCl}_4$ +DTTAc	18550 ± 2050 ^c	66 ± 9 ^d	3,60 ± 0.25 ^e
3 horas			
$^{14}\text{CCl}_4$	10180 ± 1650	91 ± 11	9,04 ± 1.11
$^{14}\text{CCl}_4$ +DTTAc	15180 ± 2150 ^d	67 ± 8 ^d	4,47 ± 0.88 ^d

^a Las ratas pretratadas con DTTAc con una dosis de 200 mg/kg (ip) se inyectaron con una solución de $^{14}\text{CCl}_4$ al 5% (v/v) en aceite de oliva (14×10^6 dpm/ml), con una dosis de 5 ml/kg (ip). Los animales se sacrificaron 1 y 3 horas después de la administración del tóxico. Se utilizaron 8 animales por grupo.

^b R es el cociente entre UC y la concentración hepática de CCl_4 .

^c $p > 0.05$ cuando se compara con el correspondiente grupo CCl_4 .

^d $p < 0.0001$ cuando se compara con el correspondiente grupo CCl_4 .

^e $p < 0.001$ cuando se compara con el correspondiente grupo CCl_4 .

Figura IV.12: Representación gráfica del efecto del pretratamiento con DTTAc en la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado de ratas

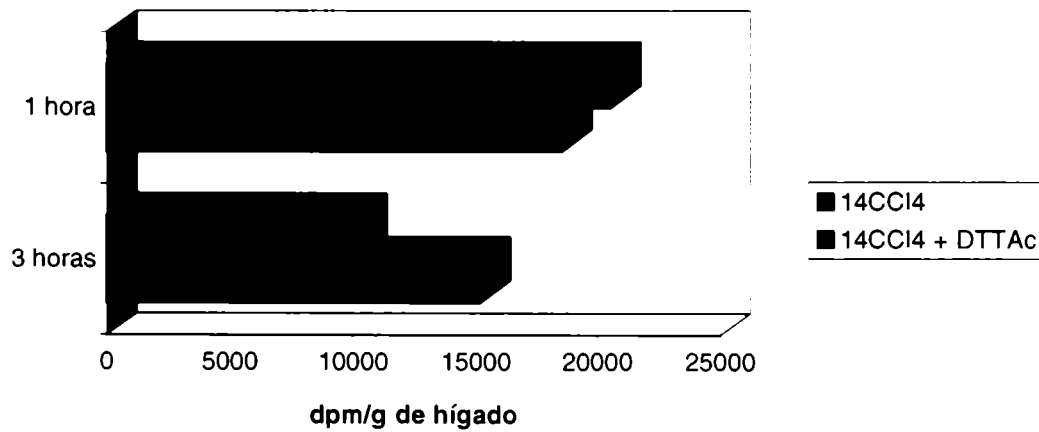


Figura IV.13: Representación gráfica del efecto del pretratamiento con DTTAc en la UC de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales

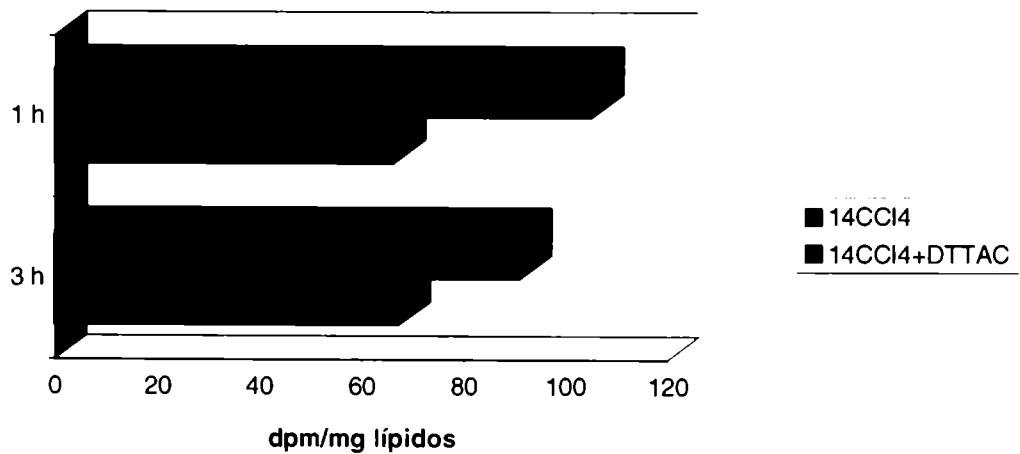
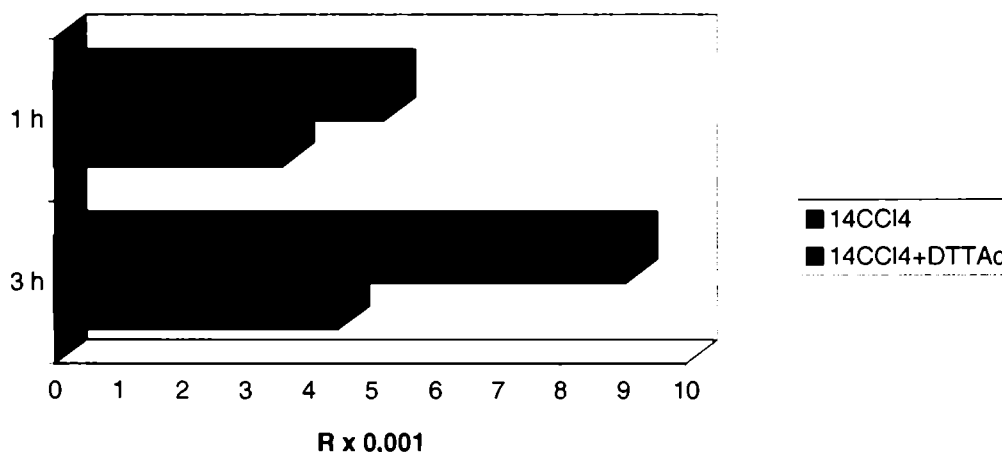


Figura IV.14: Representación gráfica de la relación entre la UC y la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado de ratas pretratadas con DTTAc



Se determinó la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado de ratas (Tabla IV.7) para ver si el DTTAc la modificaba.

Se observó que 1 h después de la administración de $^{14}\text{CCl}_4$ a ratas pretratadas con DTTAc no se modificó significativamente la concentración del tóxico comparado con el de animales no tratados. Sin embargo 3 h después fue significativamente superior en los animales pretratados con DTTAc.

También se midió la unión covalente de metabolitos reactivos del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales hepáticos (Tabla IV.7).

La administración previa de DTTAc a ratas disminuyó significativamente la unión covalente de CCl_4 a lípidos microsomales evaluado a 1 y 3 h después de la intoxicación.

Se calculó el cociente entre la unión covalente y la respectiva concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado de ratas pretratadas con DTTAc (R).

Dicha relación (Tabla IV.6 y Figura IV.14) da idea de la capacidad intrínseca de la fracción microsomal de hígado de ratas de activar el CCl_4 a metabolitos reactivos, que se unen covalentemente a los lípidos, por unidad de concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado. La misma disminuyó significativamente en los animales pretratados con DTTAc, 1 y 3 h después de la administración del $^{14}\text{CCl}_4$.

RESULTADOS

IV.6 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON DTTAc EN LA PEROXIDACION DE LIPIDOS MICROSOMALES INDUCIDA POR CCl₄

Los resultados del pretratamiento con DTTAc en la PL inducida por CCl₄ se observan en la Tabla IV.7.

Tabla IV.7: Efecto del pretratamiento con DTTAc en la peroxidación de lípidos microsomales inducida por CCl₄

Peroxidación lipídica in vivo \pm DE ^b				
Tratamiento ^a	1 h	% Control	3 h	% Control
Control	263 \pm 51	100	153 \pm 32	100
CCl ₄	475 \pm 35 ^c	181	287 \pm 27 ^c	188
DTTAc	255 \pm 38 ^d	97	155 \pm 34 ^d	101
DTTAc+CCl ₄	454 \pm 66 ^{e,f}	173	262 \pm 24 ^{e,f}	171

^a Las ratas pretratadas con DTTAc con una dosis 200 mg/kg ip se inyectaron con 1 ml CCl₄/kg (ip). Los animales se sacrificaron 1 y 3 horas después de la administración del tóxico. Se utilizaron 5 animales por grupo.

^b La peroxidación lipídica se expresa como la absorbancia a 243 nm x 1000 para una solución que contiene 1 mg lípido/ml.

^c p<0.001 cuando se compara con el correspondiente grupo control.

^d p>0.05 cuando se compara con el correspondiente grupo control.

^e p<0.001 cuando se compara con el correspondiente grupo DTTAc.

^f p>0.05 cuando se compara con el grupo CCl₄.

Las medidas de la peroxidación lipídica microsomal revelaron que el DTTAc no produce peroxidación a 1 y 3 h por el método basado en la absorción ultravioleta de los dienos conjugados de los extractos lipídicos y tampoco modificó la intensidad del proceso de peroxidación inducida por CCl₄ a 1 y 3 h de intoxicados los animales.

RESULTADOS

IV.7 EFECTO DEL DTT EN LA FORMACION DE MALONDIALDEHIDO PRODUCIDO DURANTE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS MICROSOMALES PROVOCADA POR EL CCl₄ IN VITRO

El método empleado determina los aldehídos formados por degradación de los hidroperóxidos y endoperóxidos, incluyendo el malondialdehído. En general se llaman sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Los resultados se indican en la Tabla IV.8.

Tabla IV.8: Efecto del DTT sobre la formación de TBARS durante la peroxidación de lípidos microsomaes producida por el CCl₄ in vitro.

	TBARS ± DE ^a (μmoles/g prot)		
	Sin DTT	Con DTT	
		1 mM	3 mM
Control	0.85 ± 0.06	0.67 ± 0.08	0.76 ± 0.19
NADPH	24.72 ± 1.15 ^b	19.39 ± 2.66 ^d	10.68 ± 1.72 ^e
CCl ₄	1.16 ± 0.28	0.75 ± 0.12	0.90 ± 0.09
NADPH+CCl ₄	39.90 ± 0.73 ^{b,c}	33.60 ± 1.76 ^f	29.91 ± 1.52 ^f

^a Los resultados corresponden al promedio de cinco determinaciones independientes.

^b p < 0.001 cuando se compara con el correspondiente grupo control.

^c p < 0.001 cuando se compara con el correspondiente grupo NADPH.

^d p < 0.01 cuando se compara con el grupo NADPH sin DTT.

^e p < 0.001 cuando se compara con el grupo NADPH sin DTT.

^f p < 0.001 cuando se compara con el grupo NADPH + CCl₄ sin DTT.

Los resultados indican que el sistema generador de NADPH promovió significativamente la peroxidación de lípidos (PL) y en presencia de CCl₄ fue todavía mayor que cuando había solo sistema generador de NADPH.

RESULTADOS

La PL promovida por el sistema generador de NADPH disminuyó significativamente con el DTT 1 mM y 3 mM. A su vez existió diferencia significativa entre las dos concentraciones de DTT. La peroxidación de lípidos promovida por el sistema generador más CCl₄ también fue disminuída significativamente por el DTT a ambas concentraciones, existiendo diferencia significativa entre ellas.

IV.9 REACCION DEL DTT CON PEROXIDOS ORGANICOS

En la PL se generan peróxidos e hidroperóxidos que son muy reactivos. Se estudió si el DTT sería capaz de bloquearlos haciéndolo reaccionar con un peróxido modelo, el peróxido de benzoílo. Los resultados se observan en la Tabla IV.9.

Tabla IV.9: Efecto del DTT sobre el peróxido de benzoílo.

	Concentración de grupos sulfhidrilos \pm DE ^a (μ M)
DTT	21.58 \pm 1.25
DTT+peróxido de benzoílo	6.79 \pm 2.40

^a Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones independientes.

Los valores obtenidos muestran que la concentración de sulfhidrilos disminuye significativamente en presencia de peróxido de benzoílo ($p < 0.001$).

V. DISCUSSION

V.1 NIVELES SANGUINEOS Y HEPATICOS DE DTT EN RATAS TRATADAS CON DTTAc. DETERMINACION Y CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DTTAc-TIOLACETATO ESTERASA.

Los resultados obtenidos por CGL/EM de los niveles en sangre e hígado de DTTTox evidenciaron que el DTTAc se hidrolizó completamente in vivo, ya que no se pudo detectar el compuesto original, aún 1 hora después de administrado a ratas.

Los estudios realizados demostraron que el DTTAc llega rápidamente al hígado cuando se administra ip a ratas. La alta liposolubilidad observada en el ensayo de determinación del coeficiente de partición, explica su eficiente penetración en el tejido hepático. No puede descartarse, sin embargo, que la droga sea capaz de llegar al hígado en formas parcial o totalmente desacetiladas y que éstas se generen en otros órganos y/o en plasma.

La rápida transformación del DTTAc a DTT con los grupos SH activos completamente desacetilados sugiere la existencia, además de las clásicas O-esterasas, de tiol-acetato esterasas que tienen una significativa capacidad de promover la hidrólisis del compuesto. Esto se demostró en diferentes órganos, en sangre total, plasma y en distintas fracciones subcelulares hepáticas de rata.

La actividad DTTAc-tiolacetato esterasa resultó en el siguiente orden: intestino delgado >> hígado > páncreas >> testículos > riñón ~ cerebro ~ adrenales ~ médula ósea ~ colon ~ pulmón > plasma ~ corazón > sangre total.

Se hace notar que los valores obtenidos en sangre total fueron más bajos que los esperados por la contribución de la actividad enzimática en plasma; esto sugiere que los glóbulos rojos contienen alguna sustancia que se libera al hemolizarlos y que tiene un efecto inhibitor sobre la enzima del plasma.

En el hígado, a su vez la distribución de la enzima fue heterogénea. En efecto, en las distintas fracciones subcelulares hepáticas, la actividad enzimática fue máxima en la fracción microsomal seguida por la fracción mitocondrial. Los núcleos presentaron mucha menor actividad.

La presencia de mayor actividad en la fracción microsomal podría ser de relevancia puesto que ello aseguraría la generación del metabolito activo del DTTAc, el

DISCUSION

DTT, en el retículo endoplásmico. En este sitio celular la formación de los metabolitos reactivos del CCl_4 ($\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$) ocurre con mayor intensidad. También en esa organela es donde se verifica en mayor proporción el proceso de peroxidación de lípidos promovido por el CCl_4 . Recordemos que la biotransformación del CCl_4 y la peroxidación de lípidos promovida por él son consideradas críticas en relación a la toxicidad de este compuesto para el hepatocito.

También es interesante haber encontrado que la actividad DTTAc-Est está presente en mitocondrias y núcleos, dado que ambas organelas pueden generar cierta proporción de $\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ (Díaz Gómez y col., 1980a,b; Castro CR de y col., 1984; Castro GD y col., 1990). En el caso de los núcleos, el tóxico puede además promover la peroxidación de lípidos. La biotransformación mitocondrial del CCl_4 parecería ser importante en alteraciones que son más evidentes en etapas tardías del proceso de daño celular. Estas provendrían del consumo significativo del NADPH durante la biotransformación del CCl_4 en esa organela (Slater y col., 1964; Slater y Sawyer, 1977)).

La posibilidad de generar DTT en el núcleo es de gran relevancia, puesto que ello le permitiría a este metabolito interferir con las interacciones dañinas de $\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ y los peróxidos provenientes de la PL nuclear promovida por el CCl_4 . Estas interacciones con el ADN y proteínas nucleares fueron evidenciadas en nuestro laboratorio anteriormente (Castro GD y col., 1989a).

V.2 PREVENCIÓN DE LA NECROSIS HEPÁTICA CON DTTAc

El efecto protector del DTTAc sobre la necrosis hepática inducida por el CCl_4 tiene algunas características interesantes. El DTTAc es efectivo no sólo cuando se administra simultáneamente sino también dado 3 horas después de la hepatotoxina. Pero las acciones preventivas ya no se observan cuando el DTTAc se suministra 6 ó 10 horas después del tóxico.

Por un lado, trabajos de varios laboratorios, incluido el nuestro, con otros agentes protectores que actúan disminuyendo la UC o la PL, no protegieron contra la necrosis producida por el CCl_4 cuando fueron administrados después del tóxico (Castro JA, 1990). Por lo tanto, es difícil explicar las propiedades terapéuticas del DTTAc sobre la necrosis hepática cuando se dio tres horas después del tóxico, solamente estudiando sus efectos sobre la UC y la PL.

Por otro lado, los así llamados agentes protectores "tardíos" descubiertos en el laboratorio (Ferreyra y col., 1989, 1992, 1993; Castro JA, 1990; González Padrón, y col., 1993; Valles y col., 1994) son también efectivos 6 y 10 horas después de administrar el CCl_4 , aún cuando en esos tiempos de intoxicación ya han muerto algunas células (Gorla y col. 1983; Castro JA, 1990).

Los resultados del tratamiento con DTTAc a las tres horas del envenenamiento sugieren que, además de los efectos sobre la UC o la PL, el compuesto podría impedir o disminuir la intensidad de algún otro proceso adverso desconocido. Alternativamente, los resultados obtenidos podrían indicar que la generación de DTT a partir de DTTAc vía esterasas está afectada después de las 3 horas de la intoxicación.

V.3 ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE ACCION DEL DTTAc

V.3.1 Efecto del DTT sobre la unión covalente (UC) del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales

El DTTAc administrado no modificó la concentración del CCl_4 en el hígado a 1 hora de la intoxicación. Sin embargo, 3 horas después la concentración fue significativamente superior en los animales pretratados con DTTAc.

La administración previa de DTTAc fue capaz de disminuir significativamente la UC de los metabolitos reactivos del CCl_4 a componentes celulares evaluados a 1 y 3 horas de la intoxicación. Esto sugiere que el DTT puede inhibir la etapa de bioactivación del CCl_4 a $\bullet\text{CCl}_3$ responsable de la UC (Castro JA, 1984; Slater 1982) o que los atrapa para dar productos de reacción estables. También el DTT podría donar átomos de H al radical libre para generar CHCl_3 . Los experimentos realizados no permiten discriminar entre las diferentes posibilidades o determinar si más de una o todas ellas están en juego.

Estudios recientes de nuestro laboratorio en sistemas modelo donde se generan catalíticamente los radicales libres $\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$, evidenciaron que el DTT es capaz de atrapar a ambos radicales o de donar átomos de H a éstos y a los radicales libres que se formen en las moléculas blanco (Mecca y col., 1995). Ello explicaría por qué la UC está disminuída en animales tratados con DTTAc, impidiendo o revertiendo así el daño producido por los mencionados radicales sobre las macromoléculas.

La relación entre la UC y la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado (R) da idea de la capacidad intrínseca de la fracción microsomal de hígado de ratas para activar al CCl_4 a metabolitos reactivos, que se unen covalentemente a los lípidos, por unidad de concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado. Dicha relación disminuyó significativamente en los animales pretratados con DTTAc, a 1 y 3 horas después de la administración del $^{14}\text{CCl}_4$. Como las concentraciones de $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado no estaban modificadas (a 1 hora) o eran superiores (a 3 horas), resulta evidente que el DTT interfiere específicamente con la interacción misma.

V.3.2 Efecto del DTT sobre la peroxidación de lípidos microsomales (PL)

La administración de DTTAc no produjo un efecto detectable sobre la PL promovida por el CCl_4 , cuando ésta se evaluó por la técnica basada en la absorción ultravioleta de los dienos conjugados. Si bien el DTT es capaz de atrapar o donar H a los radicales $\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ (Mecca y col., 1995), dicho efecto no es suficientemente intenso para evitar que se inicie la PL. Esto indicaría que una potencial acción antioxidante del DTT no se produciría en la etapa de propagación de la PL (Halliwell y Gutteridge, 1990) al menos en nuestras condiciones experimentales.

En cambio, se comprobó que el DTT disminuyó significativamente la PL, cuando se determinó a través del ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (fundamentalmente malondialdehído). Ello indicaría que el DTT interfiere en algún paso del proceso de la PL en la etapa oxígeno-dependiente de la misma. Una posibilidad es que reaccione con radicales alcoholes, peróxidos o con hidroperóxidos, peróxidos y otros compuestos, generados también en pasos anteriores a la formación de aldehídos reactivos.

Los presentes estudios parecen reforzar esta hipótesis ya que en efecto, se encontró que el DTT fue capaz de destruir peróxidos orgánicos (ej. peróxido de benzoílo). Tampoco resulta improbable que el DTT reaccione con los radicales libres alcoholilo o hidroperoxilo u otros que puedan ocurrir durante la PL, a la luz de su establecida capacidad para desactivar $\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ (Mecca y col., 1995).

Además se observó en otros estudios de nuestro laboratorio que el DTT reacciona con el 4-hidroxi-2-nonenal (Toranzo y Castro, 1995) que es considerado un mediador crítico de los efectos dañinos de la PL (Esterbauer, 1982).

Estudios previos de otros laboratorios utilizando diferentes sistemas para desencadenar la PL y otros procedimientos para su detección, reportaron alternativamente al DTT como un inhibidor o como un activador de la PL (Kamitaki y col., 1977; Haenen y col., 1989; Lissi y col., 1989; Zimmerman y Kays, 1991). Esto no es una sorpresa, ya que varias moléculas que contienen grupos tioles exhiben propiedades bifásicas de acuerdo a la concentración y otras características del sistema experimental empleado (Held y Melder, 1987; Munday, 1989).

DISCUSION

Los efectos de activación del DTT sobre la PL se observaron solo a altas concentraciones y fueron a nivel de la propagación de la misma. Ello se debería a su capacidad de producir especies de oxígeno reactivas tales como $O_2^{\cdot -}$ y HO^{\cdot} (Munday, 1989). Las propiedades inhibitorias del DTT, cuando se observaron, ocurrieron a menor concentración y fueron transitorias, debido a que prolonga el período de inducción de la PL (Bertoli y col., 1983). Después de este período de inducción no queda efecto inhibitorio significativo (Bertoli y col., 1983). Esto podría explicar por qué no observamos disminución de la PL cuando medimos dienos conjugados.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo:

a) Se realizó la síntesis del DTTAc y caracterización por CGL/EM y ^1H -RMN. El producto obtenido no contenía impurezas detectables por CGL/EM provenientes del proceso de síntesis.

b) Se estableció por CGL/EM que el DTTAc es capaz de generar rápidamente DTT como metabolito, in vivo; para ello se verificó su presencia tanto en sangre como en tejido hepático.

c) Se estableció que en distintos órganos y en sangre existen enzimas capaces de efectuar la hidrólisis de DTTAc a DTT. El orden de actividad DTTAc-Est resultó:

intestino delgado >> hígado > páncreas >> testículos > riñón ~ cerebro ~ adrenales ~ médula ósea ~ colon ~ pulmón > plasma ~ corazón > sangre total.

También se encontró una distribución heterogénea de la enzima en el hígado. La actividad enzimática fue máxima en la fracción microsomal, seguida por la fracción mitocondrial. Los núcleos presentaron mucha menos actividad y el citosol no evidenció actividad detectable.

d) La administración de DTTAc, simultáneamente con el CCl_4 y 3 h después del mismo a ratas, fue capaz de prevenir significativamente el efecto necrogénico de la hepatotoxina.

e) Considerando:

- Los resultados obtenidos estudiando el efecto del tratamiento con DTTAc sobre la UC y la PL in vivo.
- Los estudios in vitro con DTT sobre la inhibición de la PL microsomal estimulada por CCl_4 .
- Los experimentos acerca de la destrucción de peróxidos con DTT.
- Los efectos bloqueantes del DTT sobre el ataque del $\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ a componentes celulares en sistemas modelo.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Anders MW y Pohl LR (1985). Halogenated alkanes. En: Anders MW (ed). Bioactivation of foreign compounds. Academic Press, New York 283-315.
- Ansari GA, Moslen MT y Reynolds ES (1982). Evidence for in vivo covalent binding of $\bullet\text{CCl}_3$ derived from CCl_4 to cholesterol of rat liver. *Biochem Pharmacol* 31: 3509-3510.
- Benedetti A, Comporti M y Esterbauer H (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytosolic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochem Biophys Acta* 620: 281-296.
- Bernacchi AS, Castro CR de, Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1982). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole administration on the early CCl_4 -induced ultrastructural alterations in rat liver. *Brit J Exptl Pathol* 63: 35-42.
- Bernacchi AS, Fernández G, Villarruel MC, Ferreyra EC de, Castro CR de, Fenos OM de y Castro JA (1988). Further studies on the late preventive effects of the anticalmodulin trifluoperazine on carbon tetrachloride induced liver necrosis. *Exptl Mol Pathol* 48: 286-300.
- Bertoli GM, Müller A, Cadenas E y Sies H (1983). Antioxidant effect of diethyl dithiocarbamate on microsomal lipid peroxidation assessed by low-level chemiluminescence and alkane production. *FEBS Lett* 164: 371-374.
- Brigelius R (1985). Mixed Disulfids: Biological Functions and increase in oxidative stress. En: Sies H (ed). *Oxidative Stress*. Academic Press, New York, pp 243-272.
- Cadenas E y Sies H (1984). Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet-molecular oxygen. En: *Biological System Methods in Enzimology* Vol 105: 221-231.
- Castro CR de, Bernacchi AS, Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1978). Carbon tetrachloride induced ultrastructural alterations in pancreatic acinar cells and in the hepatocytes. Similarities and differences. *Toxicology* 11: 289-296.
- Castro CR de, Bernacchi AS, Villarruel MC, Fernández G y Castro JA (1984). Carbon tetrachloride activation by highly purified liver mitochondrial preparations. *Agents and Actions* 15: 664-667.
- Castro GD y Castro JA (1985). Studies on the pentane evolution by rats treated with nifurtimox or benznidazole. *Toxicology* 35: 319-326.

BIBLIOGRAFIA

- Castro GD, Lopez AJ, Petricio A y Castro JA (1986). Effect of pretreatment with pyrazole, cystamine or diphenyl-p-phenylene diamine (DPPD) on the CCl₄ promoted pentane evolution in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 52: 137-140
- Castro GD y Castro JA (1988). Formación de especies químicas reactivas durante la biotransformación de sustancias extrañas al organismo y toxicología. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 22: 221-238.
- Castro GD, Díaz Gómez MI y Castro JA (1989a). Species differences in the interaction between CCl₄ reactive metabolites and liver DNA or nuclear protein fractions. *Carcinogenesis* 10: 289-294.
- Castro GD, Díaz Gómez MI y Castro JA (1989b). Dimethylsulfide formation during trichloromethyl radical attack on metionine. *Biochem Pharmacol* 38: 4145-4147.
- Castro GD y Castro JA (1990). Reacciones de abstracción de hidrógeno de los radicales libres, peroxidación de lípidos y toxicología. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 24: 127-146.
- Castro GD, Díaz Gómez MI y Castro JA (1990). Biotransformation of carbon tetrachloride and lipid peroxidation promotion by liver nuclear preparations from different animal species. *Cancer Lett* 53: 9-15.
- Castro GD, Díaz Gómez MI y Castro JA (1991). Interaction of trichloromethyl free radicals with phenylalanine. *Arch Toxicol* 65: 340-343.
- Castro GD y Castro JA (1993). Cytosine attack by free radicals arising from bromotrichloromethane in the presence of benzoyl peroxide catalyst: a mass spectrometric study. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 13: 235-245.
- Castro GD, Stamato CJ y Castro JA (1994a). Tyrosine attack by free radicals derived from catalytic decomposition of carbon tetrachloride. *Free Rad Biol Med* 16: 693-701.
- Castro GD, Simpson JT y Castro JA (1994b). Interaction of trichloromethyl free radicals with thymine in a model system: a mass spectrometric study. *Chem Biol Inter* 90: 13-22.
- Castro GD, Stamato CJ y Castro JA (1994c). 5-Methylcytosine attack by free radicals arising from bromotrichloromethane in a model system. Structure of reactions products. *Free Rad Biol Med* 17: 419-428.

BIBLIOGRAFIA

- Castro GD y Castro JA (1995) Tryptophan reaction with free radical arisen from carbon tetrachloride in a model system. Redox Report, en prensa.
- Castro GD, Stamato CJ y Castro JA (1995a). Proline interaction with trichloromethyl and trichloromethyl peroxy free radicals in a model system. Studies about the nature of the reaction products formed. Drug Metab Rev 27: 257-275.
- Castro GD, Stamato CJ y Castro JA (1995b). Reaction of bromotrichloromethane derived free radicals with uracil in a model system. Structure of products formed. Free Rad Res 23: 431-442.
- Castro JA, Sasame HA, Sussman H y Gillette JR (1968). Diverse effects of SKF 625A and antioxidants on carbon tetrachloride-induced changes in liver microsomal P-450 content and ethylmorphine metabolism. Life Sci 7: 129-136.
- Castro JA y Díaz Gómez MI (1972). Studies on the irreversible binding of $^{14}\text{C-CCl}_4$ to microsomal lipids in rats under varying experimental conditions. Toxicol Appl Pharmacol 23: 541-552.
- Castro JA, Castro CR de, Fenos OM de, Ferreyra EC de, Díaz Gómez MI y D'Acosta N (1972a). Effect of cystamine on the mixed function oxygenase system from rat liver microsomes and its preventive effects on the destruction of cytochrome P450 by carbon tetrachloride. Pharmacol Res Commun 4: 185-190.
- Castro JA, Díaz Gómez MI, Ferreyra EC de, Castro CR de, D'Acosta N y Fenos OM de (1972b). Carbon tetrachloride effect on rat liver and adrenals related to their mixed function oxygenase content. Biochem Biophys Res Commun 47: 315-321.
- Castro JA, Cignoli EV, Castro CR de y Fenos OM de (1972c). Prevention by cystamine of liver necrosis and early biochemical alterations induced by carbon tetrachloride. Biochem Pharmacol 21: 49-57.
- Castro JA, Castro CR de, D'Acosta N, Díaz Gómez MI y Ferreyra EC de (1973a). Carbon tetrachloride activation in liver microsomes from rats induced with 3-methylcholantrene. Biochem Biophys Res Commun 50: 273-279.
- Castro JA, Ferreyra EC de, Castro CR de, Díaz Gómez MI, D'Acosta N y Fenos OM de (1973b). Studies on the mechanism of cystamine prevention of several liver structural and biochemical alterations caused by carbon tetrachloride. Toxicol Appl Pharmacol 24: 1-19.

BIBLIOGRAFIA

- Castro JA, Díaz Gómez MI, Ferreyra EC de, Castro CR de, D'Acosta N y Fenos OM de (1973c). Differences in the carbon tetrachloride induced damage to components of the smooth and rough endoplasmic reticulum from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 50: 337-343.
- Castro JA (1983). Cancer, alimentación y alimento. Epidemiología y etiología del cáncer de estómago. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 17: 3-9.
- Castro JA (1984). Mechanistical studies and prevention of free radical cell injury. En: *Proceedings of the 9th International Congress of Pharmacology (IUPHAR)*, Vol 2, pp 243-250. Mac Millan, London.
- Castro JA (1985). Biotransformación de sustancias extrañas al organismo. Reacciones y enzimas involucradas. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 19: 201-213.
- Castro JA (1990). Prevention of chemically induced liver injury. En: Goldstein RS, Hewit W and Hook JB (eds). *Toxic Interactions between chemicals, mechanisms and effects*. Academic Press, New York, pp 233-257.
- Castro JA (1993). Toxicología básica. Mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 27: 197-206
- Cawthorne MA; Bunyan J; Sennitt MV y Green J (1970). Vitamin E and hepatotoxic agents III. Vitamin E synthetic antioxidants and carbon tetrachloride toxicity in the rat. *Brit J Nutr* 24: 357-384.
- Cessi C, Colombini C y Mameli L (1966). The reaction of liver proteins with a metabolite of carbon tetrachloride. *Biochem J* 101: 46c-47c.
- Cleland WW (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3: 480-486.
- Comporti M (1987). Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 45: 143-169.
- Cunnings SW y Prough RA (1983). En: *Biological basis of detoxification*. Caldwell J y Jakoby WB (eds), pp 1-30, Academic Press, New York.
- D'Acosta N, Castro JA, Ferreyra EC de, Díaz Gómez MI y Castro CR de (1972). Pyrazole blockade of carbon tetrachloride activation and liver necrosis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 4: 641-650.
- Dianzani MU (1987). The role of free radicals in liver damage. *Proc Nutr Soc* 46: 43-52.

BIBLIOGRAFIA

- Dianzani MU (1992). Free radicals in physiology and pathology. *Boll Soc Ital Biol Sper* 68: 491-511.
- Díaz Gómez MI, Castro JA, Ferreyra EC de, D'Acosta N y Castro CR de (1973). Irreversible binding of $^{14}\text{CCl}_4$ to liver microsomal lipids and proteins from rats pretreated with compounds altering microsomal mixed function oxygenase activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 25: 534-541.
- Díaz Gómez MI, Castro CR de, D'Acosta N, Fenos OM de, Ferreyra EC de y Castro JA (1975). Species differences in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. The role of CCl_4 activation and of lipid peroxidation. *Toxicol Appl Pharmacol* 34: 102-114.
- Díaz Gómez MI y Castro JA (1980a). Nuclear activation of carbon tetrachloride and chloroform. *Pharmacology* 27: 191-194.
- Díaz Gómez MI y Castro JA (1980b). Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to liver nuclear DNA, proteins and lipids. *Toxicol Appl Pharmacol* 56: 199-206.
- Díaz Gómez MI y Castro JA (1981). Reaction of trichloromethyl free radicals with deoxyribonucleic acid bases. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 32: 147-153.
- Di Fiori MFH (1974). Técnica histológica. En: *Diagnóstico histológico*. Tomo I, pág 96. El Ateneo, Buenos Aires, Séptima edición.
- Ellman GL (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
- Esterbauer H (1982). Aldehydic products of lipid peroxidation. En: Mc Brien DCH and Slater TF (eds) *Free Radicals, lipid peroxidation and cancer*, pp 101-122, Academic Press, New York.
- Esterbauer H, Shaur RJ, Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 11: 81-128.
- Falconi C, Scotto P y De Franciscis P (1970). Radioprotection and recovery by dithiothreitol. *Experientia* 26: 172-173.
- Farber JL (1979). En: Farber E y Fisher MM (eds) *Toxic injury of the liver, Part A*, pp 215-241, Dekker, New York.
- Farber JL (1981). The role of calcium in cell death. *Life Sci* 9: 1289-1295.

BIBLIOGRAFIA

- Farber JL (1982). Biology of disease. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab Invest* 47: 114-123.
- Fernández G, Villarruel MC, Toranzo EGD y Castro JA (1982). Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to the heme moiety of cytochrome P-450 and its degradation products. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 35: 282-290.
- Fernández G, Villarruel MC, Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1986). Imipramine prevention of carbon tetrachloride-induced liver necrosis at late states of the intoxication process. *J Appl Toxicol* 6: 413-418.
- Ferreyra EC de, Castro JA, Díaz Gómez MI, D'Acosta N, Castro CR de y Fenos OM de (1974). Prevention and treatment of carbon tetrachloride hepatotoxicity by cysteine. Studies about its mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 27: 558-568.
- Ferreyra EC de, Castro JA, Díaz Gómez MI, D'Acosta N, Castro CR de y Fenos OM de (1975). Diverse effects of antioxidants on carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 32: 504-512.
- Ferreyra EC de, Fenos OM de, Bernacchi AS, Castro CR de y Castro JA (1977). Treatment of CCl₄-induced liver necrosis with chemical compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 42: 513-521.
- Ferreyra EC de, Fenos OM de, Bernacchi AS, Castro CR de y Castro JA (1979a). Therapeutic effectiveness of cystamine and cysteine to reduce liver cell necrosis induced by several hepatotoxins. *Toxicol Appl Pharmacol* 48: 221-228.
- Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1979b). Diverse response of cycloheximide-treated rats to liver injury elicited by dimethylnitrosamine; thioacetamide; bromobenzene; allyl alcohol or aflatoxin B₁. *Toxicol Lett* 4: 183-187.
- Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1983a). Late preventive effects of dimethylnitrosamine, thioacetamide or galactosamine-induced liver necrosis of the inhibitor of proteases phenylmethanesulfonyl fluoride. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 42: 505-508.
- Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1983b). Modulation on galactosamine-induced liver injury by some amino acids or triton WR 1339. *Toxicol Lett* 16: 63-67.

BIBLIOGRAFIA

- Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1984a). Late preventive effects of phenylmethylsulfonylfluoride on carbon tetrachloride induced liver necrosis. *Toxicol Lett* 21: 173-178.
- Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1984b). Late preventive effects on carbon tetrachloride induced necrosis of the inhibitor of proteases 1-chloro-3-tosyl-amido-7-amino-2-heptatone (TLCK). *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 46: 289-292.
- Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1985). Late preventive effects of several anticalmodulin drugs on galactosamine-induced liver necrosis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 47: 289-292.
- Ferreyra EC de, Bernacchi AS y Castro JA (1986). Increased glutathione (GSH) content in livers of control and CCl₄ poisoned rats treated with the anticalmodulin drug trifluoperazine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 53: 399-402.
- Ferreyra EC de, Villarruel MC, Bernacchi AS, Fernández G, Fenos OM de y Castro JA (1989). Late preventive effects against carbon tetrachloride induced liver necrosis of the calcium chelating agent calcion. *Arch Toxicol* 63: 450-455.
- Ferreyra EC de, Villarruel MC, Bernacchi AS, Fenos OM de y Castro JA (1992). Prevention of carbon tetrachloride-induced liver necrosis by the chelator alizarin sodium sulfonate. *Exptl Mol Pathol* 56: 197-207.
- Ferreyra EC de, Bernacchi AS, Villarruel MC, Fenos OM de y Castro JA (1993). Prevention of CCl₄-induced liver necrosis by the calcium chelator Arsenazo III. *Exptl Mol Pathol* 58: 194-204.
- Fishbein L (1976). Industrial mutagens and potential mutagens. I. Halogenated aliphatic derivatives. *Mutat Res* 32: 267-308.
- Frankel EN (1982). Volatile lipid oxidation products. *Progress Lipid Res* 22: 1-33.
- Frankel EN (1985). Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progress Lipid Res* 23: 197-221.
- Frankel EN (1987). Secondary products of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44: 73-85.
- Gillette JR, Mitchell JR, Brodie BB (1974). Biochemical mechanisms of drug toxicity. *Ann Rev Pharmacol* 14: 271-288.

BIBLIOGRAFIA

- Glenn Sipes I y Jay Gandolfi J (1986). Biotransformation of Toxicants. En: Klaassen CD, Amdur MO y Doull J (eds) Casarett and Doull's Toxicology - The basic science of poisons, pp 64-98, Mc Millan Publishing Co, New York.
- González FJ y Gelboni HV (1994). Role of human cytochromes P-450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxics. *Drug Met Rev* 26: 165-183.
- González Padrón A, Toranzo EGD de y Castro JA (1993). Late preventive effects of quinacrine on carbon tetrachloride-induced liver necrosis. *Arch Toxicol* 67: 386-391.
- Gorla N, Ferreyra EC de, Villarruel MC, Fenos OM de y Castro JA (1983). Studies on the mechanism of glutathione prevention of carbon tetrachloride-induced liver injury. *Brit J Exptl Pathol* 64: 388-395.
- Gram TE y Gillette JR (1971). Biotransformation of drugs. En: Bacq ZM (ed). *Fundamentals of Biochemical Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, pp 571-609.
- Haenen GR, Vermeulen NP, Timmerman H y Bast A (1989). Effects of thiols on lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Chem Biol Interact* 71: 201-212.
- Halliwell B y Gutteridge JMC (1985). The importance of free radical and catalytic metal ions in human diseases. *Molec Aspects Med* 8: 89-193.
- Halliwell B y Gutteridge JMC (eds) (1990). *Free radicals in biology and medicine*, 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford, pp 234-260.
- Harmann AW y Self G (1986). Comparison of the protective effects of N-Acetylcysteine, 2-mercaptopropionyl-glycine and dithiothreitol against acetaminophen toxicity in mouse hepatocytes. *Toxicology* 41: 83-93.
- Held KD y Melder DC (1987). Toxicity of the sulphhydryl-containing radioprotector dithiothreitol. *Radiat Res* 112: 544-554.
- Heymann E (1980). Carboxyl esterases and amidases. En: *Enzymatic Basis of Detoxication*, Vol II, edited by WB Jakoby (Academic Press, New York): 291-323.
- Holtzman JL (1982). Role of reactive oxygen and metabolite binding in drug toxicity. *Life Sci* 30: 1-9.
- Hormann VA, Moore DR y Rikans LE (1989). Relative contributions of protein sulfhydryl loss and lipid peroxidation to allyl alcohol-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 98: 375-384.

BIBLIOGRAFIA

- Horton A y Fairhurst S (1987). Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 18: 28-79.
- IARC (1972). Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Chlorinated hydrocarbons. International agency for research on cancer. IARC-WHO Lyon, France. Vol 1, 53-60.
- IARC Monographs (1979). Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Some halogenated hydrocarbons. Vol 20: 371-389. International Agency for Research on Cancer, IARC-WHO, Lyon, France.
- IARC Monographs (1987). Evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs. Vol 1 a 42. IARC-WHO, Lyon, France. Supplement 7, 143-144.
- Instant Biostatistics (1990-1993) Versión 2.0. Graph Pad Software, San Diego, CA, USA.
- Jacoby WB, Habig WH, Keen JH, Ketley JN y Pabst MJ (1976). En: Arias IM y Jakoby WB, (eds) Glutathione: metabolism and function, pp 189-211, Raven, New York.
- Jacoby WB y Habig WH (1980). Glutathione transferases. En *Enzymatic basis of detoxification* (ed. WB Jacoby) Vol II, pp 63-94, Academic Press, New York.
- Janzen EG, Stronks HJ, Dubose CM, Poyer JL y McCay PB (1985). Chemistry and biology of spin-trapping radicals associated with halocarbon metabolism 'in vitro' and 'in vivo'. *Environ Health Perspec* 64: 151-170.
- Jocelyn PC (1972). Biochemistry of the SH group. Academic Press, New York: 94-115.
- Jocelyn PC (1987). Chemical reduction of disulfides. *Methods in Enzymology* 143: 246-256.
- Johansson I, Ekstrom G, Schotte B, Puzycki D; Jornvall H y Ingelman-Undberg M (1988). Ethanol, fasting and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver. Regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies. *Biochemistry* 27: 1925-1934.
- Kamitaki T, Sugita O, Ozawa N y Kitagawa H (1977). Stabilization and induction of a lipid peroxidation inhibitor present in the soluble fraction of rat liver homogenates. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 40: 283-290.
- Kappus H y Sies H (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism. Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* 37: 1233-1241.

BIBLIOGRAFIA

- Kappus H (1985). Lipid peroxidation: Mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. En: Sies H (ed) Oxidative Stress. Academic Press, New York, pp 273-310.
- Kappus H (1987). A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. Chem Phys Lipids 45: 105-115.
- Kitta D, Schwarz M, Tennekes H, Uehleke H y Kunz W (1982). Covalent binding of CCl₄-intermediates to reduce pyridine nucleotides in mouse liver En: Snyder R (ed) Biological Reactive Intermediates, Vol 2, pp 769-777, Plenum Press, New York.
- Klaassen CD y Plaa GL (1969). Comparison of the chemical alterations elicited in livers from rats treated with carbon tetrachloride, chloroform, 1,1,2-trichloroethane and 1,1,1-trichloroethane. Biochem. Pharmacol. 18: 2019-2027.
- Klaassen CD y Doull J.(1980). Evaluation of safety: Toxicologic evaluation. En Doull J, Klaassen CD y Amdur MO (eds). Casarett and Doulls' Toxicology. The basic science of poisons. Macmillan Publishing CO, Inc. New York 11-27.
- Kurooka S, Hashimoto M, Tomita M, Maki A y Yashimura Y (1976). Relationship between the structures of S-acylthiol compounds and their rates of hydrolysis by pancreatic lipase and hepatic carboxyl esterase. J Biochem 79: 533-541.
- Link B, Dürk H, Thiel D y Frank H (1984). Binding of trichloromethyl radicals to lipids of the hepatic endoplasmic reticulum during tetrachloromethane metabolism. Biochem J 223: 577-586.
- Lissi EA, Caceres T, Llesuy S, Solari L, Boveris A y Videla LA (1989). On the characteristics of the visible chemiluminiscence following free radical lipid peroxidation. Free Rad Res Commun 6: 293-301.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI y Randall RJ (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.
- MacDonald TL (1983). Chemical mechanisms of halocarbon metabolism. Crit Rev Toxicol 11: 85-120.
- Marzi A, Toranzo EGD de y Castro JA (1980a). Mechanism of chlorpromazine prevention of carbon tetrachloride induced liver necrosis. Toxicol Appl Pharmacol 52: 82-88.

BIBLIOGRAFIA

- Marzi A, Toranzo EGD y Castro JA (1980b). Studies on the prevention of CCl₄-induced liver necrosis by agents having effects on cell membrane. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 30: 581-584.
- Masana M, Toranzo EGD de y Castro JA (1984). Reductive metabolism and activation of benznidazole. *Biochem Pharmacol* 33: 1041-1045.
- McLean AE (1967a). Effect of hexane and carbon tetrachloride on microsomal cytochrome P450. *Biochem Pharmacol* 16: 2030-2038.
- McLean AE (1967b). The effect of diet and vitamin E on liver injury due to carbon tetrachloride. *Brit J Pathol* 48: 632-635.
- McLean AE y Verschuuren HG (1969). Effects of diet and microsomal enzyme induction on the toxicity of dimethyl nitrosamine. *Brit J Exptl Pathol* 50: 22-25.
- McLean AE y Day PA (1974). The use of new methods to measure the effect of diet and inducers of microsomal enzyme system of cytochrome P-450 in liver homogenates and on the metabolism of dimethylnitrosamine. *Biochem Pharmacol* 23: 1173-1180.
- McLean AE y Mattocks AR (1980). Environmental liver injury: plant toxins. En *Toxic Injury of the Liver* (eds Farber E y Fishe MH) Part B 517-539, Dekker, New York.
- Mecca MM de, Castro GD, Díaz Gómez MI y Castro JA (1995). *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 88: 205-213.
- Meister A (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220: 472-477.
- Metrione RM (1972). The thiolesterase activity of leucine aminopeptidase. *Biochim Biophys Acta* 268: 518-522.
- Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR y Brodie BB (1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exptl Ther* 187, 185-194.
- Mitchell JR, Nelson SD, Thorgeirsson SS, McMurtry RJ y Dybing E (1976). En: Popper H, Schaffner A (eds). *Progress in liver diseases*. Vol V Gruneland Strathan Inc, New York, pp 259-279.
- Mitchell JR, Corcoran GB, Smith CV, Hughes H y Latenburg BH (1982). Alkylation and peroxidation injury from chemically reactive metabolites. En: *Biological reactive*

BIBLIOGRAFIA

- intermediates, II, Chemical Mechanisms and Biological Effects, part A, pp 199-223, New York, Plenum Press.
- Mitchell JR, Smith CV, Lauterburg BH, Hughes H, Corcoran GB y Horning EC (1984). Reactive metabolites and the pathophysiology of acute lethal cell injury. En: Mitchell JR y Horning MG (eds) Drug metabolism and drug toxicity, pp 301-319, Raven Press, New York.
- Munday R (1989). Toxicity of thiols and disulfides: Involvement of free radical species. *Free Rad Biol Med* 7: 659-673.
- Nadeau D y Marchand C (1973). Importance of the route of administration of CCl₄ in the protective effect of promethazine. *Biochem Pharmacol* 22: 1250-1252.
- National Academy of Sciences (1978). Chloroform, carbon tetrachloride and other halomethanes: An environmental assessment. Washington DC 1-249.
- Nayak NC y Chopra P (1980). Carbon tetrachloride toxicity, failure of promethazine to prevent in vivo liver injury. *Indian J Med Res* 72: 546-553.
- Orrenius S, Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Jones O y Smith MT (1983). En: Larson A y col., (eds) Functions of glutathione: biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects, pp 261-271, Raven, New York.
- Parke DV y Williams RT (1969). Metabolism of toxic substances. *Br Med Bull* 25: 256-262.
- Plaa GL y Witschi H (1976). Chemicals drugs and lipid peroxidation. *Annu Rev Pharmacol* 16: 125-141.
- Poli G, Albano E y Dianzani MU (1987). The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 45: 117-142.
- Pryor WA (1982). Free radical biology: xenobiotic, cancer and aging. *Ann NY Acad Sci* 393: 1-22.
- Recknagel RO y Litteria N (1960). Biochemical changes in carbon tetrachloride fatty liver. Concentration of carbon tetrachloride in liver and blood. *Am J Pathol* 36: 521-531.
- Recknagel RO (1967). Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev* 19: 145-208.
- Recknagel RO y Glende EA (1973). CCl₄ hepatotoxicity: An example of lethal cleavage. *Crit Rev Toxicol* 2: 263-297.

BIBLIOGRAFIA

- Recknagel RO (1983). Carbon tetrachloride hepatotoxicity: status quo and future prospects. *Trends Pharmac Sci*, 129-131.
- Recknagel RO, Glende EA, Dolok JA y Waller RL (1989). Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43: 134-154.
- Rees KR (1965). The protective action of drugs in experimental liver injury. En: McIntyre N and Sherlock S (eds). *Therapeutic Agents and the liver*, pp 43-50. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Reynolds ES (1967). Liver parenchymal cell injury. IV. Pattern of incorporation of carbon and chlorine from carbon tetrachloride into chemical constituent of liver in vivo. *Exptl Ther* 155: 117-126.
- Reynolds ES y Moslen MT (1980a). Free radical damage in liver. En: Pryor WA (ed) *Free radicals in biology IV*, cap 2 49-94.
- Reynolds ES y Moslen MT (1980b). Environmental liver injury: Halogenated hydrocarbons. En: Farber E y Ficher MM (eds) *Toxic injury of the liver. Part B*, pp 541-596, Decker M, New York.
- Rocchi P, Prodi G, Grilli S y Ferrari AM (1973). In vivo and in vitro binding of CCl_4 with nucleic acids and proteins in rat and mouse liver. *Intl J Cancer* 11: 419-425.
- Sacchi A, Ferrini U y Cammarano P (1971). Isolation and characterization of mitochondrial ribosomes in rat liver. *Ital J Biochem* 191-203.
- Sasame HA, Castro JA y Gillette JR (1968). Studies on the destruction of liver microsomal cytochrome P-450 by carbon tetrachloride administration. *Biochem Pharmacol* 17: 1759-1768.
- Schauestein E, Esterbauer H y Zollner H (1977). En: *Aldehydes in biological systems their nature occurrence and biological activities*, pp 88-102, Pion London.
- Sedlak J y Lindsay RH (1968). Estimation of total, protein-bound, and non protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's Reagent. *Anal Biochem* 25: 192-205.
- Sevanian A y Hochstein P (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr* 5: 365-390.
- Siegers CP, Filser JG y Bolt HM (1978). Effect of dithiocarbon metabolism and covalent binding of carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 46: 709-716
- Sies H (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91 (3C): 315-385.

BIBLIOGRAFIA

- Slater TF, Sträuli VD y Sawyer BC (1964), Changes in liver nucleotide concentrations in experimental liver injury. I. Carbon tetrachloride poisoning. *Biochem J* 93: 260-266.
- Slater TF (1966). Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: A speculative mechanism based on activation. *Nature* 209: 36-40.
- Slater TF y Sawyer BC (1977). The effects of CCl₄ on the content of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in rat liver. *Chem Biol Inter* 16: 359-364.
- Slater TF (1978). Free radical mechanisms of liver injury. En: Slater TF (ed) *Biochemical mechanisms of liver injury*, pp 745-801. Academic Press, New York.
- Slater TF (1982). Activation of carbon tetrachloride: Chemical principles and biological significance. En: Mc Brien DCH, Slater TF (eds) *Free radicals, lipid peroxidation and cancer*, pp 243-270, New York: Academic Press.
- Slater TF (1984). Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222: 1-15.
- Smuckler EA (1968). Structure and function of the endoplasmic reticulum in animal cells. Univertetsforlaget, Oslo.
- Smuckler EA y Arcasoy M (1969). Structural and functional changes of the endoplasmic reticulum of hepatic parenchymals cells. *Int Rev Exptl Pathol* 7: 305-407.
- Smuckler EA y James JL (1984). Irreversible cell injury. *Pharmacol Rev* 36: 775-915.
- Sterkel S, Spencer J, Wolfson S y Williams Ashman H (1958). Serum isocitric dehydrogenase activity with particular reference to liver disease. *J. Lab. Clin. Med.* 52: 176-184.
- Suss R, Kunzel V y Scribner J (1986). *Cancer experiments and concepts*, pp 1-275. Springer Verlag, New York.
- Toranzo EGD de, Villarruel MC y Castro JA (1978). Early destruction of cytochrome P450 in testis of carbon tetrachloride poisoned rats. *Toxicology* 10: 39-44.
- Toranzo EGD de y Castro JA (1980). Evidence against the formation of malondialdehyde derived fluorescent products in rat liver during CCl₄ poisoning. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 29: 385-388.
- Toranzo EGD de, Marzi A y Castro JA (1980). Promethazine administration to rats and CCl₄-induced lipid peroxidation of liver microsomal lipids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 30: 91-98.

BIBLIOGRAFIA

- Toranzo EGD de, Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1983). Prevention of carbon tetrachloride-induced liver necrosis by several aminoacids. *Brit J Exptl Pathol* 64: 166-171.
- Toranzo EGD de y Castro JA (1995). Reaction of 4-hydroxynonenal with some thiol-containing radioprotective agents or their active metabolites. *Free Rad Biol Med* 18,1: 1-3.
- Torrielli MV (1978). En: *Biochemical mechanisms of liver injury* (Ed Slater TF) pp 623-668. Academic Press, New York.
- Trudell JR, Bösterling R y Trevor AJ (1982). Reductive metabolism of carbon tetrachloride by human cytochrome P450 reconstituted in phospholipid vesicles: Mass spectral identification of trichloromethyl radicals bound to dioleoyl phosphatidylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2678-2686.
- Trump BF, McDowell EM y Arstila AV (1980). Cellular reaction to injury. En: Hill RB y La Via MF (eds) *Principles of Pathology*, pp 20-111, Oxford University Press, New York.
- Trush MA, Mimnaugh EG y Gram TE (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity, *Biochem Pharmacol* 31: 3335-3346.
- Uehleke H, Hellmer K y Tabarelli S (1973). Binding of ^{14}C -carbon tetrachloride to microsomal proteins in vitro and formation of CHCl_3 by reduced liver ribosomes. *Xenobiotica* 3: 1-11.
- US EPA (1980). Ambient water quality criteria for carbon tetrachloride, EPA 440/5-80-026, US EPA. Washington DC.
- US EPA (1983). Health assessment document for carbon tetrachloride, EPA 600/8-82-001. Environmental Criteria and Assessment Office, EPA, Cincinnati, Ohio.
- Valles EG, Castro CR de y Castro JA (1994). N-acetyl cyteine is an early but also a late preventive agent against carbon tetrachloride-induced liver necrosis. *Toxicol Lett* 71: 87-95.
- Villarruel MC y Castro JA (1973). Carbon tetrachloride target lipids in rat liver microsomas effect of cystamine administration on their pattern of labeling by $^{14}\text{CCl}_4$. *Biochem Biophys Res Commun* 54: 108-115.

BIBLIOGRAFIA

- Villarruel MC y Castro JA (1975). Irreversible binding of carbon tetrachloride to microsomal phospholipids. Free radical nature of the reactive species and alteration in the physico-chemical properties of the target fatty acids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 10: 105-116.
- Villarruel MC, Díaz Gómez MI y Castro JA (1975). The nature of the in vitro irreversible binding of carbon tetrachloride to microsomal lipids. *Toxicol Appl Pharmacol* 33: 106-114.
- Villarruel MC, Toranzo EGD de y Castro JA (1976). CCl₄ administration to strain A/J mice or rats and the arachidonic acid content of their liver microsomal phospholipids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 14: 193-196.
- Villarruel MC, Toranzo EGD de y Castro JA (1977). CCl₄ activation, lipid peroxidation and the mixed function oxygenase activity of various rat tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 41: 337-344.
- Villarruel MC y Castro JA (1980). Reactions of trichloromethyl free radicals with amino acids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 28: 79-85.
- Villarruel MC, Fernández G, Ferreyra EC de, Fenos OM de y Castro JA (1986). Late preventive effects of trifluoperazine on carbon tetrachloride-induced hepatic necrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 83: 287-293.
- Villarruel MC, Fernández G, Aguilar E y Castro JA (1987). Early biochemical alteration in liver mitochondria from carbon tetrachloride poisoned rats. *J Appl Toxicol* 7: 173-177.
- Viviani A, Lutz WK y Schlatter C (1978). Time course of the induction of arylhydrocarbon hydroxylase in rat liver nuclei and microsomes by phenobarbital, 3-methyl cholanthrene, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, dieldrin and other inducers. *Biochem Pharmacol* 27: 191-194.
- Warenycia MW, Goodwin LR, Francom DM, Dieken FP, Kombian SB y Reifferstein RJ (1990). Dithiothreitol liberates non-acid labile sulfide from brain tissue of H₂S-poisoned animals. *Arch Toxicol* 64: 650-655.
- Weatherall M (1949). The antidotal activity of some dithiols and acetylthiols in mice poisoned with oxophenarsine. *J Pharm Pharmacol* 1: 576-592.
- Wills ED (1987). En: *Biochemical Toxicology. A practical approach*, Chapter 6, Edited by KP Snell y Millak B. IRL Press Oxford, Washington DC pp 138-140.

BIBLIOGRAFIA

- Wislocki PG, Miwa GT y Lu AY (1980). En: Jacoby WB (ed) Enzymatic basis of detoxification, Vol I, pp 135-182, Academic Press, New York.
- Zimmerman WF y Keys S (1991). Effects of the antioxidants dithiothreitol and vitamin E on phospholipid metabolism in isolated rod outer segments. *Exptl Eye Res* 52: 607-612.

APENDICE

Parte de los resultados presentados en este Trabajo de Tesis dieron origen a las siguientes presentaciones a congresos y publicaciones.

Tratamiento de daños celulares mediados por estres oxidativo con ésteres de ditiotreitól. I. Prevención de la necrosis hepática por tetracloruro de carbono. En colaboración. Presentado en la XXVIII Reunión Anual de SAIB, Huerta Grande, Córdoba, 18 al 21 de Noviembre de 1992.

Antioxidative stress therapy with dithiothreitol tetraacetate: I. Protection against carbon tetrachloride induced liver necrosis. En colaboración. Presentado en el 1993 Annual Meeting de la Sociedad Estadounidense de Toxicología (SOT), Nueva Orleans, USA, 14 al 18 de Marzo de 1993.

Antioxidative stress therapy with dithiothreitol tetraacetate. I. Protection against carbon tetrachloride induced liver necrosis.

M. Montalto de Mecca, GD Castro y JA Castro.

Archives of Toxicology 67: 547-551 (1993).

Dithiothreitol tetraacetate S-acetyl esterase activity in blood and in different tissues of male rats.

M. Montalto de Mecca, GD Castro y JA Castro.

Archives Internationales de Pharmacologie et de Pharmacodynamie Vol. 326: 101-108 (1993).

Dithiothreitol inhibitory effects on carbon tetrachloride-promoted NADPH-dependent lipid peroxidation in liver microsomal suspensions.

M. Montalto de Mecca, GD Castro, MI Díaz Gómez y JA Castro.

Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 88: 205-213 (1995).

ABREVIATURAS

CGL	cromatografía gas líquido
CMC	carboximetilcelulosa
DE	desviación estandar
d.i.	diámetro interno
dpm	desintegraciones por minuto
DPPD	difenil-p-fenilendiamina
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
DTT	ditiotreitól
DTTAc	tetraacetato de ditiotreitól
DTTAc-Est	DTTAc-tiolacetato esterasa
DTTox	ditiotreitól oxidado
EDTA	sal disódica del ácido etilendiamino-tetraacético
EM	espectrometría de masas
eV	electrón volt
FAD	flavina adenina dinucleótido
FMN	flavinmononucleótido
g	gramo
GSH	glutación reducido
h	hora
¹ H-RMN	resonancia magnética nuclear
ICD	isocítrico deshidrogenasa
ip	intraperitoneal
kg	kilogramo
L•	radicales lipídicos
LH	lípidos
LO•	radicales alcohoxilo
L=O	compuestos carbonílicos de lípidos
LOO•	radicales lipoperoxilo
LOOH	hidroperóxidos lipídicos
m	metro

ABREVIATURAS

CGL	cromatografía gas líquido
CMC	carboximetilcelulosa
DE	desviación estandar
d.i.	diámetro interno
dpm	desintegraciones por minuto
DPPD	difenil-p-fenilendiamina
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
DTT	ditiotreitól
DTTAc	tetraacetato de ditiotreitól
DTTAc-Est	DTTAc-tiolacetato esterasa
DTTox	ditiotreitól oxidado
EDTA	sal disódica del ácido etilendiamino-tetraacético
EM	espectrometría de masas
eV	electrón volt
FAD	flavina adenina dinucleótido
FMN	flavinmononucleótido
g	gramo
GSH	glutación reducido
h	hora
^1H -RMN	resonancia magnética nuclear
ICD	isocítrico deshidrogenasa
ip	intraperitoneal
kg	kilogramo
L•	radicales lipídicos
LH	lípidos
LO•	radicales alcohoxilo
L=O	compuestos carbonílicos de lípidos
LOO•	radicales lipoperoxilo
LOOH	hidroperóxidos lipídicos
m	metro

M	molar
MFOS	sistema de la oxidasa de función mixta
mg	miligramo
MHz	megahertz
mm	milímetro
mM	milimolar
min	minuto
ml	mililitro
mseg	milisegundo
N	normal
NADH	nicotinamida dinucleótido reducido
NADPH	nicotinamida dinucleótido fosfato reducido
nm	nanometro
nmol	nanomol
p.a.	para análisis
PL	peroxidación de lípidos
PPO	2,5-difeniloxazole
prot	proteínas
PUFA	ácidos grasos polinosaturados
P-450	citocromo P-450
RC=O	compuestos carbonílicos
REL	retículo endoplásmico liso
RER	retículo endoplásmico rugoso
SH	grupo sulfhidrilo
SIM	monitoreo selectivo de iones
SKF-525A	clorhidrato de 2,2-difenilvalerato de N,N-dietilaminoetilo
SOD	superóxido dismutasa
U	unidad enzimática
UC	unión covalente
vol.	volúmen
v/v	volúmen en volúmen

TCA	ácido tricloroacético
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
µg	microgramo
µl	microlitro
µm	micrometro